



Ana Cláudia Afonso Nogueira

Licenciada em Bioquímica

**Culturas de Células em Suspensão de
Medicago truncatula expressando L-PGDS
humana: estabelecimento de linhas
transgênicas estáveis e purificação do
produto recombinante**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Ana Sofia Pires, ITQB-UNL

Co-orientador: Doutora Rita Abranches, ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira

Arguente: Prof. Doutor Manuel Pedro Salema Fevereiro

Vogal: Doutora Ana Sofia Pires



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011



Ana Cláudia Afonso Nogueira

Licenciada em Bioquímica

**Culturas de Células em Suspensão de *Medicago truncatula* expressando L-PGDS humana:
estabelecimento de linhas transgénicas estáveis e
purificação do produto recombinante**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Doutora Ana Sofia Pires, ITQB-UNL

Co-orientador: Doutora Rita Abranches, ITQB-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira

Arguente: Prof. Doutor Manuel Pedro Salema Fevereiro

Vogal: Doutora Ana Sofia Pires



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011

Culturas de Células em Suspensão de *Medicago truncatula* expressando L-PGDS humana: estabelecimento de linhas transgénicas estáveis e purificação do produto recombinante

Copyright Ana Cláudia Afonso Nogueira, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de reservar este espaço para agradecer às pessoas que, directa e indirectamente, contribuíram para a realização da minha tese de mestrado.

Começar com um enorme e mais profundo obrigada aos meus pais, Elsa e Vítor, e ao meu irmão Ricardo. Pelo suporte fundamental que têm sido ao longo de toda a minha vida, aturando o meu mau feitio como só eles sabem. Palavras não chegam.

A toda a minha família. Por sempre acreditarem em mim e me apoiarem, pela força e pelo orgulho que demonstram. Por todo o amor.

Aos melhores amigos. Por me acompanharem durante todos estes anos, por todos os momentos. À Margarida, à Diana, à Francesca, ao Sancho, à Sara e ao Pedro, à Bá e ao Luís, ao Francisco, à João, à Inês e ao Hudson. Obrigada por estarem sempre presentes.

A todos eles agradeço de coração cheio, e com todo o amor, o que têm sido para mim. Este meu trabalho é-vos dedicado.

Quero também expressar a minha gratidão ao laboratório *Plant Cell Biology*, particularmente à Doutora Rita Abranches, pela oportunidade que me foi dada de aqui realizar o meu estágio de dissertação de mestrado. Por me ter recebido da melhor forma ao longo destes meses e por toda a motivação demonstrada no decorrer deste trabalho.

À minha orientadora, Doutora Ana Sofia Pires, um agradecimento muito especial por me ter acompanhado e ajudado durante todo este período, sempre com a maior simpatia, disponibilidade, incentivo e confiança depositada no meu trabalho. Muito obrigada Sofia, foi um prazer conhecer-te e ter trabalhado contigo.

Agradeço também à Doutora Sílvia Tavares pela simpatia demonstrada e alegria contagiante e por se mostrar sempre prestável em ajudar, contribuindo de forma essencial para o bom ambiente de trabalho no PCB.

À Rita Santos, muito obrigada. Pela companhia diária ao longo destes meses, pela ajuda, disponibilidade e paciência, como colega de laboratório mas sobretudo como amiga.

Obrigada a todos.

Ana Cláudia Nogueira

Resumo

A utilização de plantas transgênicas para a produção em larga escala de proteínas recombinantes com valor comercial e terapêutico tem merecido destaque como alternativa aos sistemas convencionais. Em particular, as culturas de células vegetais em suspensão oferecem as vantagens associadas à produção em planta e à produção em sistemas de culturas de células.

Neste projecto, foram estabelecidas e estudadas culturas celulares em suspensão de *Medicago truncatula* expressando o enzima humano prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (β -trace). Este foi um trabalho inovador no que respeita ao plano inicial de obtenção das culturas celulares por transformação directa de culturas de células *wild-type*, bem como na produção desta proteína em sistemas de expressão vegetais. Foram seguidas duas abordagens paralelas: uma visando esta transformação directa e uma alternativa partindo de plantas transgênicas estáveis expressoras de β -trace secretada. Através de ensaios de detecção do produto recombinante no meio de cultura, confirmou-se a presença do mesmo apenas nas culturas obtidas a partir de planta.

Foram abordadas diversas estratégias para a purificação da proteína a partir do meio de cultura, passando por cromatografias de afinidade com ião metálico imobilizado, bem como cromatografias de troca aniónica e catiónica, ambas sob diferentes condições de pH. Obteve-se β -trace num grau de pureza satisfatório seguindo uma estratégia de apenas dois passos, contemplando uma troca aniónica a pH 4,5 seguida de uma cromatografia de afinidade.

Num passo final, de forma a testar a existência de várias glicoformas diferentes da proteína, realizou-se uma digestão enzimática com o enzima PNGase A, contudo os resultados foram inconclusivos.

As culturas celulares em suspensão de *Medicago truncatula* apresentam-se como um sistema promissor para a produção de proteínas recombinantes. Os resultados obtidos, ainda que preliminares, podem servir como base para trabalhos futuros no âmbito do *Molecular Farming*.

Termos-chave: *Molecular Farming*, *Medicago truncatula*, culturas de células em suspensão, proteína recombinante, β -trace

Abstract

The use of transgenic plants for the large scale production of recombinant proteins with commercial and therapeutic value has emerged as an alternative to conventional systems. Particularly, plant cell suspension cultures offer the advantages of production in whole plant and production in cell culture systems.

In this study, *Medicago truncatula* cell suspension cultures expressing the human enzyme lipocalin-type prostaglandin D synthase (β -trace) were established and studied. This was the first report of direct transformation of *M. truncatula* cell cultures as well as production of β -trace protein in a plant expression system. Two parallel strategies were followed: one refers to direct transformation of *wild-type* cell cultures and another by induction of *calli* formation from stably transformed plants expressing secreted β -trace. After testing the presence of the recombinant product in the culture medium, we confirmed that the protein was present only in the cultures obtained from transgenic plants.

Several procedures were followed for the purification of β -trace from the culture medium, specifically immobilized metal affinity chromatography as well as anion and cation exchange chromatography, both under different pH conditions. Using only an anion exchange chromatography pH 4,5 as a first step followed by affinity chromatography, β -trace was obtained in a acceptable purity level.

As a final step with the aim of testing the existence of several protein glycoforms, we performed incubation with the PNGase A enzyme, however the results were inconclusive.

Medicago truncatula cell suspension cultures are a promising system for the production of recombinant proteins. The preliminary results obtained in this work could contribute to future studies in Molecular Farming.

Keywords: Molecular Farming, *Medicago truncatula*, cell suspension cultures, recombinant protein, β -trace

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	V
Índice	VII
Índice de figuras	IX
Índice de tabelas	XI
Abreviaturas	XIII
1. Introdução	1
1.1. <i>Molecular Farming</i>	1
1.2. Plantas como sistema de produção proteica	3
1.2.1. Estratégias de expressão em plantas	5
1.2.2. Espécies comuns utilizadas em <i>Molecular Farming</i>	6
1.2.3. Modificações pós-traducionais	7
1.2.4. Humanização de proteínas	8
1.2.5. Estratégias para otimização de rendimentos proteicos	9
1.3. Cultura de tecidos vegetais	10
1.3.1. Condições de cultura de tecidos vegetais	11
1.4. Culturas celulares em suspensão	11
1.4.1. Estabelecimento de culturas em suspensão	13
1.4.2. Retenção vs. secreção, <i>downstream</i> e purificação proteica	13
1.4.3. Instabilidade e degradação do produto	15
1.5. <i>Medicago truncatula</i> como emergente sistema de expressão	16
1.6. Prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS)	17
1.7. Objectivos	18
2. Materiais e Métodos	19
2.1. Material Vegetal	19
2.2. Transformação de culturas <i>wild-type</i> de <i>Medicago truncatula</i>	19
2.2.1. Preparação de culturas competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
2.2.2. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
2.2.3. PCR para verificação da presença do transgene	20
2.2.4. Aliquotagem de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> BT-AH	22
2.2.5. Co-cultura com <i>Agrobacterium tumefaciens</i> BT-AH	22
2.3. Estabelecimento de culturas celulares em suspensão a partir de planta <i>M. truncatula</i> transformada	22
2.4. Verificação da presença da β -trace recombinante	23
2.4.1. <i>Dot-Blot</i>	23

2.4.2. Western-Blot	23
2.5. Purificação da β -trace recombinante	26
2.5.1. Cromatografia de Afinidade com Lã Metálico Imobilizado (IMAC)	26
2.5.2. Cromatografia de Troca Iónica	27
2.6. Digestão com enzima PNGase A	28
2.7. Filtração a vácuo das culturas celulares	28
2.8. Extração proteica de agregados celulares	28
2.9. Concentração das amostras	28
2.9.1. Precipitação com etanol absoluto a -20°C	28
2.9.2. Ultrafiltração com dispositivos Amicon	29
3. Resultados e Discussão	31
3.1. Estabelecimento de culturas celulares em suspensão de <i>Medicago truncatula</i>	31
3.1.1. Transformação de culturas <i>wild-type</i> de <i>Medicago truncatula</i>	31
3.1.2. Indução de <i>callus</i> partindo de planta transgénica estável	33
3.2. Verificação da presença da β -trace recombinante	33
3.2.1. Culturas em suspensão obtidas por transformação directa	33
3.2.2. Culturas em suspensão obtidas a partir de <i>callus</i> transformado	34
3.3. Abordagens seguidas para purificação da β -trace do meio de cultura	35
3.3.1. Cromatografia de Afinidade	35
3.3.2. Cromatografia de Troca Iónica a pH 7,6	37
3.3.3. Cromatografia de Troca Aniónica a pH 4,5	40
3.3.4. Cromatografia de Troca Aniónica a pH 9,6	43
3.4. Estratégia adoptada e purificação de todo o meio de cultura	43
3.5. Digestão com enzima PNGase A	45
4. Conclusões e Perspectivas Futuras	47
Bibliografia	49
Anexos	55

Índice de figuras

Figura 1.1 – Comparação dos parâmetros-chave na produção de proteínas terapêuticas recombinantes em diferentes sistemas de expressão utilizados.....	5
Figura 1.2 – Adição e processamento de N-glicanos no RE e no complexo de Golgi em células vegetais e de mamífero.....	8
Figura 1.3 – Esquema representativo do processo de estabelecimento de culturas de células vegetais em suspensão para a produção de proteínas recombinantes.....	13
Figura 1.4 – Isomerização de PGH ₂ a PGD ₂ catalisada pelo enzima L-PGDS.....	17
Figura 2.1 – T-DNA de L-PGDS na forma secretada.....	19
Figura 2.2 – Sistema de electroforese horizontal Bio-Rad Mini-Sub Cell GT.....	21
Figura 2.3 – Sistema de electroforese Bio-Rad Mini – Protean 3.....	25
Figura 2.4 – Esquema de montagem de <i>sandwich</i> no sistema de transferência semi-seca.....	26
Figura 2.5 – Esquema de montagem da coluna cromatográfica para aplicação de vácuo.....	27
Figura 3.1 – Gel de electroforese resultante do PCR a colónias isoladas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformado com o plasmídeo pTRA-BT-AH realizado antes de aliquotagem.....	31
Figura 3.2 – Gel de electroforese resultante do PCR a colónias isoladas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformado com o plasmídeo pTRA-BT-AH realizado antes da transformação das culturas <i>wild-type</i>	32
Figura 3.3 – Esquema do estabelecimento de culturas de células em suspensão a partir de planta transgénica.....	33
Figura 3.4 – SDS-PAGE e Western-Blot de meio de cultura de <i>Medicago truncatula</i>	34
Figura 3.5 – SDS-PAGE e Western-Blot de fracções obtidas por cromatografia de afinidade de meio de cultura de <i>Medicago truncatula</i> , bem como referentes a meio de cultura <i>wild-type</i>	36
Figura 3.6 – Western-Blot de fracções obtidas por cromatografia de troca aniónica e catiónica de meio de cultura de <i>Medicago truncatula</i> a pH 7,6.....	38

Figura 3.7 – SDS-PAGE e Western-Blot de fracções obtidas por cromatografia de afinidade da fracção não ligada à resina catiónica SP-Sepharose a pH 7,6.....	39
Figura 3.8 – Western-Blot de fracções obtidas por cromatografia de troca aniónica de meio de cultura de <i>Medicago truncatula</i> a pH 4,5.....	40
Figura 3.9 – SDS-PAGE e Western-Blot de fracções obtidas por cromatografia de afinidade da fracção não ligada à resina aniónica DEAE-Sepharose a pH 4,5.....	41
Figura 3.10 – Western-Blot de fracções obtidas por cromatografia de troca aniónica de meio de cultura de <i>Medicago truncatula</i> a pH 9,6.....	43
Figura 3.11 – SDS-PAGE de fracções obtidas por cromatografia de afinidade da fracção não ligada à resina aniónica DEAE-Sepharose a pH 4,5.....	44
Figura 3.12 – SDS-PAGE e Western-Blot de fracções resultantes de cromatografias anteriores submetidas a digestão enzimática com PNGase A.....	46

Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Fármacos produzidos em sistemas vegetais que estão em estádios clínicos de desenvolvimento ou no mercado.....	2
Tabela 2.1 – Concentrações finais a utilizar dos vários reagentes para preparação da <i>Master Mix</i> ...	20
Tabela 2.2 – Programa utilizado no termociclador Mastercycle Eppendorf.....	21
Tabela 2.3 – Preparação dos géis de resolução (12,5% de acrilamida) e de concentração.....	24
Tabela 1 – Concentrações <i>stock</i> e final de MgSO ₄ a utilizar em meio YEB.....	55
Tabela 2 – Concentrações <i>stock</i> e final dos antibióticos utilizados para suplementar meio de cultura.....	56

Abreviaturas

2,4-D – Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
BCIP – *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate*
BSA – Albumina de soro bovino
BY-2 – *Bright Yellow-2*
CaMV – *Cauliflower mosaic virus*
DTT - *Dithiothreitol*
FT – *Flow-Through*
GSM – *Glycerol Stock Media*
HDEL - Histidina-Ácido aspártico-Ácido glutâmico-Leucina
IMAC – Cromatografia de Afinidade com Ião Metálico Imobilizado
KDEL – Lisina-Ácido aspártico-Ácido glutâmico-Leucina
PGDS – Prostaglandina D sintase
L-PGDS - Prostaglandina D sintase do tipo lipocalina
MAR – *Matrix Attachment Regions*
MS – Murashige & Skoog
MW – Peso Molecular
NBT – *Nitro-Blue Tetrazolium*
pb – pares de bases
PBS – *Phosphate Buffer Saline*
PBS-T – PBS com Tween 20
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PGD₂ – Prostaglandina D₂
PGH₂ – Prostaglandina H₂
PI – Ponto Isoelétrico
RE – Retículo Endoplasmático
SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*
SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
TAE - *Tris-Acetate-EDTA*
T-DNA – Ácido Desoxirribonucleico de Transferência
TEMED – *Tetramethylethylenediamine*
YEB - *Yeast Extract Broth*

1. Introdução

1.1. *Molecular Farming*

Desde sempre o Homem tem utilizado as plantas em seu benefício, tanto na alimentação, como para fins terapêuticos, entre outros. Para além dos animais, estas eram o principal sistema para a bioprodução de substâncias importantes (Boehm, 2007). Actualmente, e no que concerne à medicina, a biotecnologia moderna está a estender o uso das plantas muito para além dos seus limites originais, sendo agora uma fonte de proteína com aplicação farmacêutica (Fischer & Emans, 2000), como anticorpos, vacinas, hormonas, citocinas, enzimas e outras proteínas humanas (Ma *et al.*, 2003, Obembe *et al.*, 2011).

O uso de plantas para a produção em larga escala de proteínas recombinantes com valor comercial e terapêutico – *Molecular Farming* – tem surgido como alternativa aos sistemas convencionais (Fischer & Emans, 2000), desde que Fraley reportou a primeira transformação com sucesso de uma planta superior, em 1983 (Fraley *et al.*, 1983; revisto em Horn *et al.*, 2004). Desde então, os avanços biotecnológicos possibilitaram a produção de várias proteínas heterólogas em sistemas vegetais. A primeira proteína com valor farmacêutico a ser produzida em plantas remonta ao ano de 1986, quando a hormona de crescimento humano foi expressa com sucesso em tabaco transgénico (Barta *et al.*, 1986). Seguiram-se a produção de um interferão (De Zoeten *et al.*, 1989) e da albumina de soro humano (Sijmons *et al.*, 1990) (revisto em Fischer & Emans, 2000). Foram igualmente produzidos em folhas de planta de tabaco os primeiros anticorpos funcionais (Hiatt *et al.*, 1989), o que representou um avanço significativo na demonstração do potencial das plantas para a produção de proteínas complexas de mamífero com importância na medicina (Fischer & Emans, 2000). Também a autenticidade estrutural das proteínas recombinantes produzidas em planta foi confirmada, com a produção de uma vacina para o vírus da hepatite B, em 1992 (Mason *et al.*, 1992; revisto em Ma *et al.*, 2003). Contudo, só em 1997, Hood *et al.* produziram em planta a primeira proteína recombinante com o propósito específico de extracção, purificação e comercialização da mesma – a avidina, uma proteína do ovo com importantes propriedades (revisto em Horn *et al.*, 2004).

Muitos outros estudos têm sido reportados no campo da medicina, relativamente à produção em plantas de fragmentos de anticorpos, antigénios para vacinas e vários efectores biológicos (Daniell *et al.*, 2001; Fischer & Emans, 2000; Obembe *et al.*, 2011; Schillberg *et al.*, 2002). A investigação e desenvolvimento na indústria de *Molecular Farming* tem crescido consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo, existindo um vasto leque de empresas, institutos e universidades que se dedicam à investigação nesta área (Basaran & Rodríguez-Cerezo, 2008). A Planet Biotechnology produziu em tabaco transgénico o primeiro anticorpo produzido em plantas a ser clinicamente testado – CaroRxTM; este actua na prevenção das cáries dentárias, estando já aprovado na União Europeia, enquanto que nos EUA se encontra na fase II de ensaios clínicos (www.planetbiotechnology.com). Actualmente, e de particular interesse, o enzima humano glucocerebrosidase recombinante tem sido produzido em células de cenoura pela Protalix para a distribuição comercial no tratamento da doença de Gaucher (Xu *et al.*, 2011). Em 2009, a

multinacional farmacêutica Pfizer e a Protalix BioTherapeutics, Inc. elaboraram um acordo para a comercialização deste enzima, revelando assim o enorme potencial deste sector de mercado (www.protalix.com).

A Tabela 1.1 sumariza alguns dos fármacos já produzidos em sistemas vegetais que se encontram em diversas fases de ensaios clínicos de desenvolvimento ou mesmo em circulação no mercado.

Tabela 1.1 – Fármacos produzidos em sistemas vegetais que estão em estádios clínicos de desenvolvimento ou no mercado (adaptado de Obembe *et. al*, 2011).

Produto	Doença	Planta	Estádio de ensaio clínico	Companhia	Fonte
<i>Vacinas</i>					
Antigénio Hepatite B (HBsAg)	Hepatite B	Alface Batata	Fase I Fase II	Thomas Jefferson University, EUA Arizona State University, EUA	Streatfield, 2006
Proteínas de fusão, incluindo epitopos do vírus da raiva	Raiva	Espinafre	Fase I completa	Thomas Jefferson University, EUA	www.labome.org/expert/usa/.../hilar-y-koprowski-233492.html
Vacina do cancro	Linfoma não-Hodgkin	Tabaco	Fase II	Large Scale Biology, EUA	http://www.gmo-safety.eu/article/483.pharma-plants-status-report.html
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Batata	Fase I	Arizona State University	Tacket, 2005
Subunidade B da toxina lábil ao calor de <i>E. coli</i>	Diarreia	Milho Batata	Fase I Fase I	ProdiGene, EUA Arizona State University	Tacket, 2005
Proteína da cápside do vírus de Norwalk	Diarreia	Batata Tomate	Fase I	Arizona State University	Khalsa <i>et al.</i> , 2004
Antigénio	Parvovírus felino (cães)	Tabaco	Avançado	Large Scale Biology, EUA	http://www.lsb.com
Antigénio	Vírus do papiloma (coelho)	Tabaco	Inicial	Large Scale Biology, EUA	http://www.lsb.com
Proteína HN do vírus da doença de Newcastle	Doença de Newcastle (aves domésticas)	Cultura de células de tabaco	Aprovado pela USDA	Dow Agro Sciences, EUA	http://dowagro.com/animalhealth
Mistura de vacina viral	Doenças de cavalos, cães e pássaros	Cultura de células de tabaco	Fase I	Dow Agro Sciences, EUA	http://dowagro.com/animalhealth
Vacina de aves domésticas	Infecção coccidial	Canola	Fase II	Guardian Biosciences, Canadá	Basaran & Rodríguez-Cerezo, 2008
Proteína da cápside do vírus da gastroenterite (TGEV)	Gastroenterite de leitão	Milho	Fase I	ProdiGene, EUA	Basaran & Rodríguez-Cerezo, 2008
Candidato à vacina H5N1	Pandemic influenza H5N1	Tabaco	Fase I	Medicago, EUA	http://www.medicago.com
<i>Anticorpos</i>					
CaroRX	Cáries dentárias	Tabaco	Aprovado na UE como recomendação médica	Planet Biotechnology, EUA	http://planetbiotechnology.com
DoxoRX	Terapia dos efeitos secundários do cancro	Tabaco	Fase I completa	Planet Biotechnology, EUA	http://planetbiotechnology.com
RhinoRX	Constipação	Tabaco	Fase I completa	Planet Biotechnology, EUA	http://planetbiotechnology.com
Anticorpos Fv	Linfoma não-Hodgkin	Tabaco	Fase I	Large Scale Biology, EUA	http://lsbc.com
IgG (ICAM1)	Constipação	Tabaco	Fase I	Planet Biotechnology, EUA	http://planetbiotechnology.com
Anticorpo contra a hepatite B	Purificação da vacina	Tabaco	No mercado	CIGB, Cuba	Kaiser, 2008
<i>Proteínas terapêuticas humanas</i>					
Lipase gástrica, Merispase®	Fibrose cística	Milho	No mercado	Meristem Therapeutics France	http://www.meristem-therapeutics.com
α-Galactosidase	Doença de Fabry	Tabaco	Fase I	Planet Biotechnology, EUA	http://planetbiotechnology.com
Lactoferron™ (interferon α)	Hepatite B e C	Lentilha d'água	Fase II	Biolex, EUA	http://www.biolex.com
Fármaco fibrinolítico (fármaco trombolítico)	Coágulo sanguíneo	Lentilha d'água	Fase I	Biolex, EUA	http://www.biolex.com
Glucocerebrosidase humana (pGCD)	Doença de Gaucher	Cultura de células de cenoura	Aguarda aprovação da USDA	Protalix Biotherapeutics, Israel	http://www.protalix.com/glucocerebrosidase.html
Insulina	Diabetes	Cártamo	Fase III	SemBioSys, Canadá	http://sembiosys.com

Tabela 1.1 – Fármacos produzidos em sistemas vegetais que estão em estádios clínicos de desenvolvimento ou no mercado (adaptado de Obembe *et. al*, 2011) (continuação).

Produto	Doença	Planta	Estádio de ensaio clínico	Companhia	Fonte
Apolipoproteína <i>Nutraceuticos</i>	Cardiovascular	Cártamo	Fase I	SemBioSys, Canadá	http://sembiosys.com
ISOkine™, DERMokine™	Factor de crescimento humano	Cevada	No mercado	ORF Genetics	http://www.orfgenetics.com
Factor intrínseco humano, Coban	Deficiência em vit. B12	<i>Arabidopsis</i>	No mercado	Cobento Biotech AS	http://www.cobento.dk/default.asp?id=76
Lactoferrina humana	Anti-infecção, anti-inflamatório	Arroz	Avançado, no mercado como química fina	Ventria, EUA	http://www.ventriabio.com
Lisozima humana	Anti-infecção, anti-inflamatório	Arroz	Avançado, no mercado como química fina	Ventria, EUA	http://www.ventriabio.com
Immunosphere™	Aditivo alimentar para camarões	Cártamo	Entrada no mercado esperada para 2010	SemBioSys, Canadá	http://www.sembiosys.com

1.2. Plantas como sistema de produção proteica

Historicamente, as bactérias são o principal sistema de expressão de proteínas, sendo o mais bem caracterizado e mais económico. Contudo, estas são incapazes de reproduzir a complexidade das proteínas de mamífero, que requerem um *folding* extensivo e modificações pós-traducionais necessárias à actividade das mesmas (Fischer & Emans, 2000; Schillberg *et al.*, 2002), estando por isso limitadas à produção de estruturas simples que não envolvem estas modificações pós-traducionais. Aos sistemas bacterianos está também associada a formação de corpos de inclusão quando a acumulação de proteína é elevada, pelo que são necessários vários passos de renaturação para recuperação da proteína na sua forma biologicamente activa. Existe ainda o risco de possíveis contaminações por toxinas bacterianas que necessitam de ser eliminadas (Boehm, 2007).

As leveduras são outro sistema tradicional de expressão de proteínas, que não contempla algumas destas desvantagens, visto serem organismos eucarióticos. Contudo, algumas leveduras estão associadas à hiperglicosilação das proteínas produzidas, resultando em estruturas oligomanosídicas, totalmente diferentes dos N-glicanos de humanos ou mamíferos. Ainda assim, 43% dos produtos biológicos no mercado são produzidos em bactérias e leveduras (Boehm, 2007).

Actualmente, a maior parte das proteínas recombinantes (57%) é produzida em diferentes sistemas de células de mamífero, que sintetizam e processam correctamente produtos complexos, com rendimentos elevados (Boehm, 2007). No entanto, estes envolvem custos de manutenção e produção elevados, condições de cultura que necessitam de ser cuidadosamente controladas e dificuldades acrescidas no *scale-up* (Abranches *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2004; Giddings *et al.*, 2000).

Assim, e tomando como sistema de expressão ideal aquele que produz o produto biologicamente activo e mais seguro ao menor custo (Daniell *et al.*, 2001), é prudente avaliar sistemas alternativos de produção transgénica e determinar como a disponibilidade de biofármacos recombinantes seguros pode ser assegurada de forma rentável (Gidding *et al.*, 2000). Neste âmbito, a utilização de sistemas vegetais transgénicos tem surgido como uma alternativa atractiva aos sistemas convencionais de produção de proteínas recombinantes em larga escala.

Os organismos eucarióticos partilham um conjunto complexo de organelos internos que direccionam a síntese proteica, a função celular e a secreção proteica. Este sistema endomembranar é bem conservado desde leveduras a animais e plantas superiores, sendo que muitos dos sinais de tráfego e separação intracelular de proteínas são funcionais nestes vários reinos. Como tal, as plantas realizam a maioria das modificações pós-traducionais requeridas para a actividade biológica ideal das proteínas de mamífero (Schillberg *et al.*, 2002). As plantas apresentam também inúmeras vantagens sobre todos os sistemas de expressão já estabelecidos, em termos de capacidade, flexibilidade, escalabilidade e custos de produção (Boehm, 2007).

Uma das principais vantagens do uso de sistemas vegetais para a produção de proteínas recombinantes reside a nível económico. Especificamente em relação à produção de proteínas em planta cultivada, estas apresentam um baixo custo de produção em larga escala comparativamente aos sistemas tradicionais, não requerendo equipamentos sofisticados, meios de crescimento dispendiosos ou pessoal qualificado (Commandeur *et al.*, 2003). Inclusive, estimou-se que o custo de produção de proteínas recombinantes em plantas pode limitar-se a apenas 2 a 10% do custo associado aos sistemas de fermentação bacteriano e a 0,1% do custo em culturas de células de mamífero, embora tal dependa do rendimento do produto. Apesar de nem todas as proteínas poderem ser produzidas a níveis muito elevados, os rendimentos típicos na produção de proteínas farmacêuticas em plantas (0,1-1,0% das proteínas solúveis totais) são suficientemente competitivos com outros sistemas de expressão, tornando-as num sistema economicamente viável (Twyman *et al.*, 2003). Mais ainda, passos adicionais no processo de purificação podem ser eliminados quando a planta é usada como alimento, aditivo alimentar ou para consumo directo (vacinas orais) (revisto em Abranches *et al.*, 2005). As plantas transgénicas podem ser cultivadas à escala agrícola, podendo esta ser rapidamente modulada em resposta às exigências do mercado, cultivando-se mais ou menos terra consoante o requerido (Twyman *et al.*, 2003). Também em termos de validade/segurança do produto recombinante as plantas apresentam benefícios, sendo consideradas mais seguras que as bactérias e os animais por não possuírem patógenos humanos, sequências de DNA oncogénicas e endotoxinas (Commandeur *et al.*, 2003; Doran, 2000), minimizando assim os riscos para a saúde decorrentes de possíveis contaminações do produto (Abranches *et al.*, 2005). Os sistemas vegetais oferecem ainda a vantagem de ser possível direccionar as proteínas recombinantes para compartimentos intracelulares nos quais estas são mais estáveis, ou mesmo expressá-las directamente em determinados compartimentos (cloroplastos) (Daniell *et al.*, 2001). Um outro benefício associado às plantas como sistema de expressão respeita à facilidade de manipulação genética das mesmas (Fischer & Emans, 2000).

Contudo, e apesar da via de síntese proteica ser semelhante em animais e plantas, existem também algumas diferenças no que respeita às modificações pós-traducionais, em particular quanto à estrutura das cadeias de glicanos (revisto em Gomord *et al.*, 2010). Outras das limitações actuais dos sistemas vegetais de expressão de proteínas recombinantes incluem os baixos rendimentos atingidos para muitas proteínas (derivado de fraca estabilidade ou do baixo nível de expressão do transcrito) (Fischer *et al.*, 2004; Obembe *et al.*, 2011) e as dificuldades no processo de *downstream* (levando a qualidade inconsistente do produto) (Fischer *et al.*, 2004). A Figura 1.1 compara os

parâmetros principais na produção de proteínas recombinantes com valor terapêutico em diferentes sistemas de expressão.

O grande desafio consiste, então, na escolha da planta hospedeira mais apropriada para a produção de uma biomolécula específica, bem como o processo de *downstream* (Obembe *et al.*, 2011).

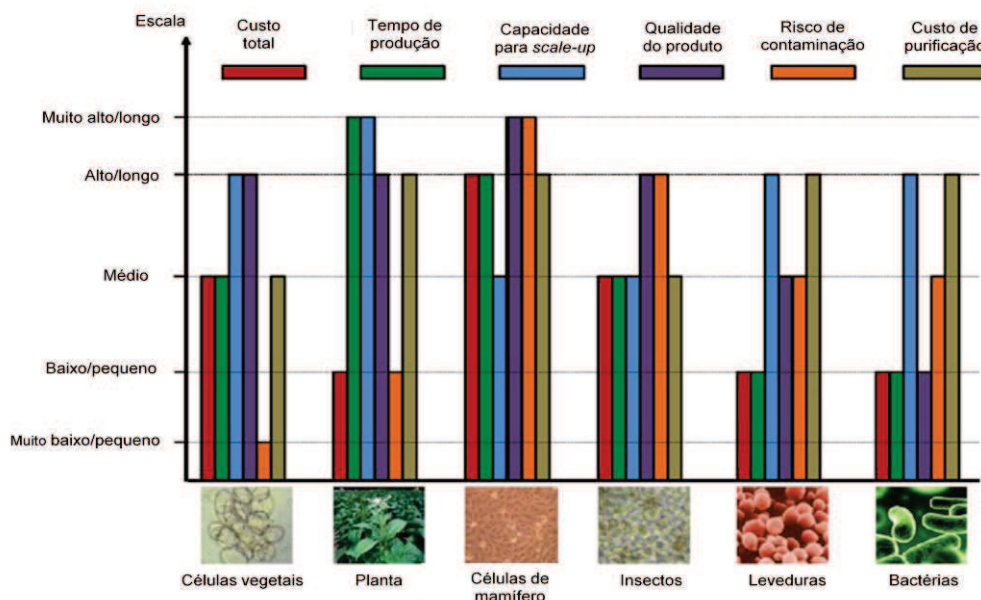


Figura 1.1 – Comparação dos parâmetros-chave na produção de proteínas terapêuticas recombinantes em diferentes sistemas de expressão utilizados. Nota: o custo de purificação num sistema de cultura de células vegetais decrescerá se as proteínas recombinantes forem secretadas para o meio de cultura (adaptado de Xu *et al.*, 2011).

1.2.1. Estratégias de expressão em plantas

No que concerne à tecnologia de transformação de plantas, várias técnicas têm sido desenvolvidas para a expressão de proteínas em plantas transformadas estáveis (em que o gene é incorporado no genoma da planta) ou transientemente em tecidos de planta. A expressão transiente é rápida, comparada com a transformação estável, e fornece resultados em alguns dias; contudo, está limitada em termos de escala e é geralmente preferível para testes de novos vectores utilizados na expressão proteica antes de se realizar a transformação estável para prosseguir para larga escala (Basaran & Rodríguez-Cerezo, 2008; Schillberg *et al.*, 2005).

Habitualmente utilizada para a produção de quantidades consideráveis de proteína em poucas semanas, a transformação transiente pode ser realizada através de diferentes métodos (Vézina *et al.*, 2009). A agroinfiltração – método desenvolvido por Kapila *et al.* (1997) – envolve a infiltração de *Agrobacterium tumefaciens* recombinante no tecido da planta, facilitando a transferência do T-DNA para uma alta percentagem de células e resultando na expressão do transgene a níveis elevados sem ocorrer transformação estável (Obembe *et al.*, 2011; Schillberg *et al.*, 2005). Um outro método, o método de infecção viral (Scholthof *et al.*, 1996), está relacionado com a capacidade dos vírus das

plantas servirem de vetores para a entrega de genes estranhos às mesmas, sem haver integração no genoma (Obembe *et al.*, 2011).

Por outro lado, a transformação estável implica a integração de um transgene no genoma da planta. O gene de interesse é clonado num vector binário que pode ser transferido entre *E. coli* e *Agrobacterium*; depois de transformado, este último transfere o gene às células hospedeiras. A transformação é acompanhada pela selecção das células com cópias integradas estáveis do gene alvo através de genes de resistência que são introduzidos no vector de expressão. Geralmente, são necessários cerca de 3 a 9 meses para gerar plantas transgénicas estáveis nas quais possa ser testada a expressão da proteína (Fischer & Emans, 2000).

1.2.2. Espécies comuns utilizadas em *Molecular Farming*

Uma grande variedade de espécies de plantas tem sido utilizada em *Molecular Farming*, tirando partido da sua facilidade de transformação e manipulação em laboratório. Dependendo de requisitos económicos e biológicos de uma proteína alvo específica, o sistema vegetal de expressão mais adequado pode ser escolhido livremente (Boehm, 2007), desde plantas modelo (tabaco, *Arabidopsis*), cereais e legumes (arroz, trigo, milho, ervilha, soja, alfalfa) a frutos (tomate, banana) e espécies solanáceas (batata) (Schillberg *et al.*, 2003; Twyman *et al.*, 2003). Entre estes, o tabaco é o sistema de expressão por excelência em *Molecular Farming*, sendo a espécie mais utilizada para a produção de proteínas farmacêuticas recombinantes (Ma *et al.*, 2003). Este estatuto de sistema hospedeiro bem estabelecido deve-se à disponibilidade de protocolos bem estabelecidos de transformação e a elementos reguladores bem caracterizados para o controlo da expressão do transgene. Adicionalmente, apresenta elevados rendimentos de biomassa e rápida escalabilidade. No entanto, o alto conteúdo em nicotina e outros alcalóides em algumas variedades de tabaco é uma desvantagem, sendo necessária a sua eliminação durante o processamento de *downstream* (Fischer *et al.*, 2004; Twyman *et al.*, 2003). A soja e a alfalfa (*Medicago sativa*) têm sido investigadas como espécies vegetais alternativas ao tabaco em *Molecular Farming*, tendo a vantagem de fixarem o nitrogénio atmosférico, reduzindo a necessidade de fertilizantes químicos (Twyman *et al.*, 2003).

Contudo, e apesar da produção em folhas ser vantajosa em termos de rendimento em biomassa, as proteínas produzidas tendem a ser instáveis. Contrariamente, a expressão em sementes possibilita o armazenamento a longo prazo, uma vez que estas têm o ambiente bioquímico apropriado à acumulação de proteína estável, sem perda de actividade (Abranches *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2004; Twyman *et al.*, 2003). A utilização de frutos para a produção de proteínas farmacêuticas recombinantes tem a principal vantagem de órgãos comestíveis poderem ser consumidos crus ou parcialmente processados, o que os torna particularmente ideais para a produção de vacinas recombinantes, nutracêuticos ou anticorpos desenhados para aplicação tópica (Fischer *et al.*, 2004).

Recentemente, outros sistemas vegetais de expressão recombinante têm emergido, tal como *Lemna gibba* e *Lemna minor*, *Chlamydomonas reinhardtii* e outras espécies de algas, *Physcomitrella patens* (musgo) e culturas celulares em suspensão de plantas superiores (Liénard *et al.*, 2007).

1.2.3. Modificações pós-traducionais

Uma das grandes vantagens dos sistemas vegetais sobre as leveduras ou os sistemas bacterianos é a sua capacidade de realizar a maioria das modificações pós-traducionais requeridas para a actividade e estabilidade das proteínas, tal como as adequadas às suas propriedades farmacocinéticas (Faye *et al.*, 2004). As modificações pós-traducionais incluem modificações covalentes (glicosilação, fosforilação, metilação, ADP-ribosilação, oxidação, glicação), processamento proteolítico e modificações não-enzimáticas (Gomord & Faye, 2004). Dentro de todas estas, a glicosilação é a mais frequente, sendo que mais de metade das proteínas produzidas em eucariotas, bem como um terço dos biofármacos aprovados, são glicoproteínas (Gomord *et al.*, 2010; Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007).

A glicosilação consiste na ligação covalente de oligossacáridos a uma cadeia polipeptídica, o que afecta as propriedades físico-químicas da proteína, como por exemplo, resistência a desnaturação termal, protecção de degradação proteolítica e solubilidade, bem como altera as suas funções biológicas essenciais (imunogenicidade, entre outras). Esta ligação de açúcares pode ser ao átomo de azoto de um resíduo de asparagina – N-glicosilação – ou ao terminal hidroxilo de um resíduo de treonina, serina, hidroxiprolina ou hidroxilisina – O-glicosilação (Faye *et al.*, 2004; Gomord *et al.*, 2010).

Nas células vegetais, como em todas as células eucariotas, a N-glicosilação de proteínas inicia-se no retículo endoplasmático (RE) através da transferência de um oligossacárido precursor ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) para um resíduo específico de asparagina presente nas denominadas sequências de N-glicosilação: asparagina – X – serina / treonina (onde X é um qualquer aminoácido, excepto a prolina). Uma vez estabelecida esta ligação, a glicoproteína é transportada ao longo da via secretora e o oligossacárido ligado à asparagina – N-glicano – sofre vários passos de maturação, tanto no RE como no complexo de Golgi, que envolvem remoção e adição sequencial de resíduos de açúcar (Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007).

A maturação dos N-glicanos nas células vegetais e de mamífero difere apenas nas modificações ocorridas no complexo de Golgi (Gomord & Faye, 2004), pelo que os N-glicanos oligomanosídicos formados no retículo têm a mesma estrutura em plantas e em mamíferos, contrariamente aos N-glicanos de tipo complexo formados no complexo de Golgi (Liénard *et al.*, 2007). A glicosilação nas células de planta caracteriza-se pela ausência de resíduos terminais de $\beta(1,4)$ galactose e ácido siálico, típicos de proteínas de mamífero. Em oposição, contempla a adição de resíduos $\alpha(1,3)$ fucose ligados ao resíduo de acetilglucosamina mais próximo da proteína, que nas células de mamífero apresenta uma ligação $\alpha(1,6)$, e, apresenta também um resíduo $\beta(1,2)$ xilose ligado a uma manose que nos mamíferos é totalmente inexistente (Ma *et al.*, 2003). Os N-glicanos vegetais apresentam ainda uma estrutura terminal característica denominada Lewis a (Le^a), constituída por um resíduo de $\beta(1,3)$ galactose e outro de $\alpha(1,4)$ fucose (Gomord *et al.*, 2010). As diferenças entre os N-glicanos de origem vegetal e de mamífero estão esquematizadas na Figura 1.2. Estes resíduos específicos de plantas constituem três glicoepitopos que apresentam ligação a IgE, provocando respostas imunes na maioria dos mamíferos de laboratório (Faye *et al.*, 2004, Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007). Assim, e de forma a prevenir o problema de imunogenicidade e reacções

alérgicas que estas diferenças podem originar, o sistema vegetal deve ser modificado de forma a que este seja capaz de realizar uma N-glicosilação do tipo humano, para que as proteínas terapêuticas produzidas em planta possam ser administradas em humanos (Obembe *et al.*, 2011).

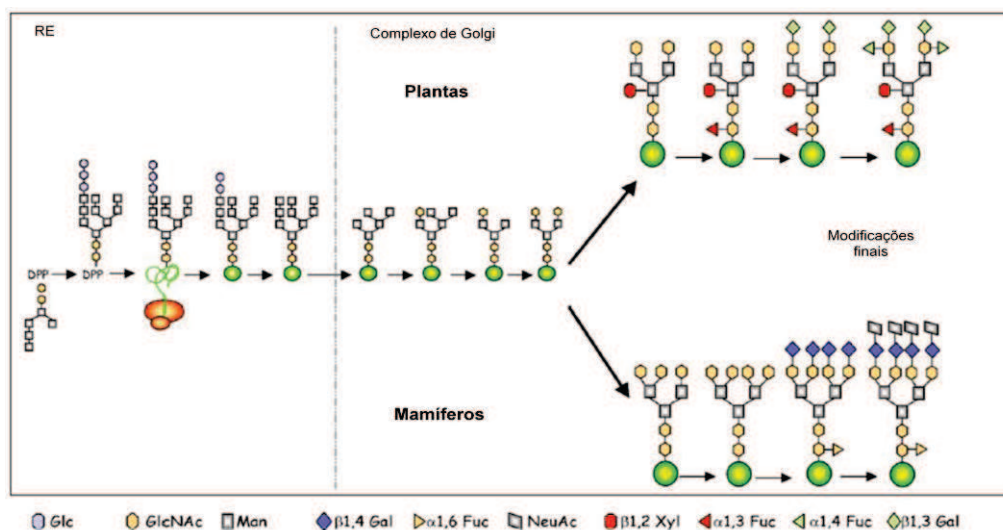


Figura 1.2 – Adição e processamento de N-glicanos no RE e no complexo de Golgi em células vegetais e de mamífero (adaptado de Faye *et al.*, 2004).

1.2.4. Humanização de proteínas

Recentemente, têm surgido progressos consideráveis no redesenhar das estruturas de N-glicanos de glicoproteínas terapêuticas nos sistemas vegetais, utilizando para tal diferentes estratégias (Gomord *et al.*, 2010).

Uma primeira estratégia passa pelo *targeting* da proteína recombinante para o lúmen do RE, onde os N-glicanos oligomanosídicos têm estruturas semelhantes em plantas e mamíferos, evitando assim as modificações pós-traducionais que ocorrem no complexo de Golgi. Para tal, tira-se partido da presença de um péptido sinal em C-terminal – H/KDEL – para a retenção da proteína no retículo (Gomord *et al.*, 2010).

Outras abordagens respeitam à inativação ou silenciamento de genes de forma a reduzir ou eliminar a actividade de glicosiltransferases específicas de planta. Mutantes da planta modelo *Arabidopsis thaliana* com *knock-out* em genes específicos, desenvolvidas por Strasser *et al.* (2004), estão disponíveis e têm permitido a produção de glicoproteínas terapêuticas desprovidas destes glicoepítopos característicos das células vegetais. Em estudos recentes, também o RNA de interferência mostrou ser uma ferramenta valiosa para o *knock-down* dos enzimas $\beta(1,2)$ xilosiltransferase e $\alpha(1,3)$ fucosiltransferase em alguns sistemas de expressão vegetais: *Lemna minor*, *Medicago sativa* e *Nicotiana benthamiana* (Cox *et al.*, 2006; Sourrouille *et al.*, 2008; Strasser *et al.*, 2008). Contrastando com a elevada eficiência desta estratégia na planta aquática *Lemna minor*, para as outras duas espécies esta técnica resultou na subexpressão destes dois enzimas, sendo que a sua inativação foi incompleta mas efectiva. Como tal, a questão agora é entender se a

engenharia de glicoproteínas em plataformas de expressão vegetais é ou não determinada pela espécie; actualmente, a resposta parece pender para a glicoproteína em questão e não para a espécie vegetal hospedeira (Gomord *et al.*, 2010; Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007). Também o epitopo Le^a típico de N-glicanos de plantas deve ser tido em consideração nestas estratégias, uma vez que é fortemente imunogénico em mamíferos; Sourrouille *et al.* (2008) reportaram recentemente a total ausência de N-glicanos complexos com glicoeptopos Le^a, obtida através da expressão competitiva de um galactosiltransferase humano em alfalfa transgénica (Gomord *et al.*, 2010).

Ainda neste contexto, outra abordagem atractiva para a humanização de N-glicanos de plantas consiste na expressão de glicosiltransferases heterólogas para a adição de resíduos de açúcar típicos de proteínas de mamífero. A maioria das glicoproteínas humanas possui ácido siálico num penúltimo resíduo de galactose, e cuja ausência em fármacos produzidos em planta reduz a sua eficiência clínica, devido a uma elevada taxa de eliminação na corrente sanguínea. Por exemplo, enquanto que Eritropoetina recombinante com ácido siálico tem um tempo de meia-vida de 5 a 6 horas, a versão correspondente sem este resíduo tem apenas 2 minutos. Foi igualmente demonstrado que o *targeting* de glicosiltransferases para uma localização subcelular específica pode melhorar fortemente a eficiência destas estratégias de *knock-in* para a humanização de proteínas. Esta abordagem de manipulação genética de glicoproteínas em plantas é mais exigente, uma vez que estas não possuem a maioria da maquinaria necessária à síntese e transferência de resíduos Neu5Ac (Gomord *et al.*, 2010; Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007). No entanto, estudos recentes reportam à construção de toda a via de biossíntese, activação, transporte e transferência destes resíduos em células vegetais (Bakker *et al.*, 2008; Castilho *et al.*, 2010; Misaki *et al.*, 2006; Paccalet *et al.*, 2007).

1.2.5. Estratégias para optimização de rendimentos proteicos

Alguns produtos proteicos requerem apenas um processamento limitado do material vegetal, sendo por isso relativamente económicos e produzidos em elevadas quantidades. No extremo oposto, produtos mais dispendiosos (como por exemplo, fármacos para administração em humanos) requerem a extracção e purificação da proteína. Os custos associados a estes podem ser minimizados através do aumento da expressão proteica, sendo este um factor essencial para uma produção recombinante económica. Como tal, diversas estratégias têm sido desenvolvidas visando o aumento dos níveis de proteínas recombinantes em sistemas de produção vegetais (Streatfield, 2007).

A optimização dos níveis de expressão do gene é talvez a abordagem que tem recebido mais atenção. É comum o uso de promotores constitutivos fortes, como são o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S) e o ubiquitina-1 de milho (*ubi-1*), para dicotiledóneas e monocotiledóneas, respectivamente (Obembe *et al.*, 2011; Streatfield, 2007). Também são utilizados promotores específicos de tecidos e de órgãos para dirigir a expressão dos transgenes, que apresentam algumas vantagens práticas e em termos de biosegurança comparativamente aos promotores constitutivos, prevenindo a acumulação proteica em órgãos vegetativos, que pode afectar negativamente o crescimento e desenvolvimento da planta. Existem ainda promotores indutíveis que

respondem a estímulos físicos e químicos externos (Ma *et al.*, 2003; Obembe *et al.*, 2011; Twyman *et al.*, 2003).

A estabilidade proteica é um factor igualmente determinante para o rendimento do produto final. O *targeting* subcelular é utilizado como metodologia comum para aumentar o rendimento de proteínas recombinantes, uma vez que o compartimento no qual a proteína se acumula influencia fortemente os processos inter-relacionados de *folding*, *assembly* e modificação pós-traducional. Tudo isto contribui para a estabilidade da proteína e, conseqüentemente, para a determinação do seu rendimento final (Twyman *et al.*, 2003). Proteínas recombinantes podem ser direccionadas para localizações subcelulares específicas através da inclusão de sequências-sinal nos vectores de expressão. Na ausência de qualquer sequência-sinal, a proteína recombinante acumula-se no citoplasma; contudo, estão disponíveis sequências-sinal de *targeting* para o apoplasto, plastídeo, mitocôndrio, vacúolos e núcleo (Streatfield, 2007).

A via secretora é um compartimento mais adequado para *folding* e *assembly* quando comparada com o citosol, levando a rendimentos proteicos elevados. No RE, o ambiente oxidante, a ausência de proteases e a abundância de chaperonas são factores importantes para um *folding* e *assembly* correctos da proteína; também a glicosilação proteica ocorre somente no sistema endomembranar, sendo esta modificação pós-traducional requerida para uma correcta função da maioria das proteínas com origem humana. Assim, uma estratégia comum combina uma sequência de *targeting* em N-terminal (péptido líder) para o apoplasto com uma sequência de retenção no RE (H/KDEL em C-terminal), resultando na retenção da proteína recombinante no RE, o que está associado a acumulação de proteína recombinante em níveis bastante elevados (Ma *et al.*, 2003; Streatfield, 2007). Sem sequências-sinal adicionais, as proteínas no sistema endomembranar são secretadas para o apoplasto, onde podem ficar retidas ou ser secretadas para o meio, o que tem importantes implicações em culturas celulares em suspensão (Ma *et al.*, 2003).

Finalmente, também a escolha do tecido para a expressão proteica pode influenciar grandemente a acumulação e estabilidade das proteínas recombinantes, o conteúdo em proteínas e em água, tal como a presença de proteases e inibidores de proteases são factores determinantes. Como já mencionado, promotores específicos de tecido permitem a expressão de proteínas recombinantes em tecidos preferenciais, como folhas e sementes (Streatfield, 2007).

1.3. Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais é a cultura asséptica de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições físicas e químicas controladas *in vitro* (Thorpe, 2007). A base teórica da cultura de tecidos vegetais foi proposta por Haberlandt, em 1902, através de estudos com cultura de células individuais; apesar de não ter sido bem sucedido devido à escolha inadequada de espécies vegetais e meios nutritivos, o seu trabalho pioneiro nesta área foi decisivo para desenvolvimentos futuros. Reconhecido como pai da cultura de tecidos vegetais, Haberlandt estabeleceu o conceito de totipotência das células vegetais, reconhecendo a célula como unidade primária de todos os organismos vivos (Thorpe, 2007; Vasil, 2008). Este conceito combinado com a transferência de

transgenes, sua integração estável e expressão nas células vegetais, a regeneração de plantas transformadas e a transmissão Mendeliana dos transgenes à descendência são a base da biotecnologia vegetal (Vasil, 2008).

Seguiram-se vários estudos que conduziram ao estabelecimento de culturas de raízes, embriões e, mais tarde, às verdadeiras culturas de tecidos derivadas de *callus*. Estas foram obtidas por Gautheret, em 1934, a partir de tecido cambial de *Acer pseudoplatanus*. Nos anos subsequentes foram desenvolvidas e optimizadas a maioria das técnicas *in vitro* usadas actualmente, tendo igualmente sido estabelecidas culturas de *callus* de diversas espécies (Thorpe, 2007).

A cultura *in vitro* de tecidos vegetais baseia-se então na totipotência da maioria das células de um explante (material vegetal) que, mantido em meio de cultura apropriado e sob determinadas condições, origina massas de células indiferenciadas (*calli*).

1.3.1. Condições de cultura de tecidos vegetais

Um factor essencial para o desenvolvimento de culturas de células vegetais é a composição do meio de cultura. O primeiro meio nutritivo utilizado para o crescimento de tecidos vegetais *in vitro* era baseado nas várias formulações nutritivas existentes para a planta inteira. Após vários desenvolvimentos e alterações na composição deste meio de cultura, Murashige e Skoog desenvolveram aquele que é actualmente o meio nutritivo mais utilizado em cultura de tecidos vegetais, o meio MS, permitindo o cultivo de várias espécies num meio constituído por macro e micronutrientes e vitaminas (Thorpe, 2007).

Ao meio MS é necessário adicionar, posteriormente, uma fonte de carbono (sacarose, habitualmente), bem como reguladores de crescimento (hormonas vegetais). A compreensão da função dos reguladores de crescimento passou por inúmeras fases, sendo que a descoberta decisiva respeitou ao reconhecimento de que a proporção de auxina e citocinina no meio de cultura influencia a morfologia do *callus*. Um nível maior de auxina relativamente a citocinina favorece a formação de raízes, enquanto que o contrário leva à formação de rebentos; já um equilíbrio entre a concentração das duas hormonas promove a proliferação de *callus* (Thorpe, 2007).

1.4. Culturas celulares em suspensão

Inicialmente, as culturas de células vegetais mostraram-se consideravelmente interessantes como potencial alternativa à agricultura tradicional para a produção industrial de metabolitos secundários de plantas. Assim, na década de 1960, foram introduzidas as primeiras tecnologias com culturas de células vegetais como uma possível ferramenta para o estudo e produção destes mesmos metabolitos (Mulabagal & Tsay, 2004). Só mais recentemente a utilização de células vegetais para a produção de compostos recombinantes com interesse comercial ganhou mais atenção; de entre os diversos sistemas de cultivo de células vegetais (*hairy roots*, teratomas, células imobilizadas), as culturas celulares em suspensão são consideradas o sistema de cultura de células

vegetais *in vitro* mais adequado para aplicações em larga escala em biotecnologia (Fischer *et al.*, 1999; Hellwig *et al.*, 2004).

Seguindo-se à expressão da primeira proteína recombinante (albumina de soro humano) em cultura de células de tabaco (Sijmons *et al.*, 1990), uma gama diversificada de proteínas farmacêuticas foi produzida em culturas de células vegetais, entre elas, anticorpos, vacinas, hormonas, factores de crescimento e citocinas (Xu *et al.*, 2011). A linha celular vegetal mais comum para a expressão de proteínas recombinantes em culturas de células é a bem caracterizada linha BY-2 (*Bright Yellow 2*), derivada de culturas de tabaco (Hellwig *et al.*, 2004). Outras espécies vegetais igualmente utilizadas para o estabelecimento de culturas celulares em suspensão são o arroz, a soja, a alfalfa e o tomate, bem como, mais recentemente, a espécie *Arabidopsis thaliana* (Hellwig *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2011).

As culturas celulares em suspensão combinam os benefícios da produção proteica em planta com as vantagens adicionais dos sistemas de cultura de células, resultando num sistema de expressão seguro e controlável (Fischer *et al.*, 1999; Hellwig *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2011). As células vegetais são pouco dispendiosas de crescer e manter, requerendo um meio sintético simples. Em contraste com as plantas, as culturas em suspensão têm ciclos de produção inferiores e oferecem a possibilidade de controlo total sobre o ambiente de produção, não existindo risco de contaminação por micotoxinas, herbicidas e pesticidas; como tal, estão associados menos obstáculos regulatórios e ambientais para a garantia da qualidade e segurança do produto, não estando sujeitas a preocupações de organismos geneticamente modificados (Doran, 2006; Hellwig *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2011). Contudo, a vantagem mais relevante relativamente à produção em planta respeita à simplicidade de procedimentos nos processos de *downstream* e purificação do produto. Esta característica é especialmente importante quando a proteína alvo é secretada para o meio de cultura, uma vez que o passo de extracção proteica é contornado, evitando disrupção celular e libertação de substâncias fenólicas e proteases; adicionalmente, o meio de cultura contém uma pequena quantidade de proteínas, reduzindo o número de passos requeridos no processo de purificação (revisto em Pires *et al.*, 2008).

Existem, no entanto, algumas limitações à utilização de culturas de células em suspensão para a produção recombinante. Estas originam geralmente baixos níveis de acumulação da proteína alvo (devido a taxas de crescimento lentas) e/ou baixos rendimentos de produto. O silenciamento de genes, a inibição do produto recombinante a altas densidades celulares ou a formação de agregados são outras das possíveis desvantagens (Fischer *et al.*, 1999; Hellwig *et al.*, 2004).

Ainda assim, esta plataforma apresenta-se como um sistema alternativo competitivo para a produção viável de proteínas de elevado preço e pureza em quantidades baixas/médias, como são muitas das proteínas com aplicação terapêutica (Doran, 2000).

1.4.1. Estabelecimento de culturas em suspensão

As culturas em suspensão são iniciadas com um explante de um órgão ou tecido de planta que é estimulado com hormonas num meio com nutrientes, sais e vitaminas, até à formação de *callus* (James & Lee, 2001). O *callus* é um tecido indiferenciado obtido pelo cultivo de explantes vegetais num meio sólido contendo a mistura apropriada de hormonas vegetais para a manutenção desse estado indiferenciado (Hellwig *et al.*, 2004). Passadas várias gerações, o *callus* pode ser transferido para meio líquido contendo as mesmas hormonas, onde as células crescerão rapidamente como uma suspensão, mantendo a condição indiferenciada (Hellwig *et al.*, 2004; James & Lee, 2001).

Linhas celulares transgênicas podem ser obtidas por indução de *callus* com tecido de planta transgênica estável expressando a proteína recombinante de interesse ou, alternativamente, por transformação directa de culturas celulares *wild-type* em suspensão (Hellwig *et al.*, 2004; Pires *et al.*, 2008). A Figura 1.3 esquematiza este processo de estabelecimento de culturas transgênicas de células vegetais em suspensão. Vários métodos de transformação são actualmente empregues em culturas celulares, como são a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, transformação via bombardeamento de partículas, por electroporação de protoplastos e utilização de vectores virais (Fischer *et al.*, 1999; Pires *et al.*, 2008).

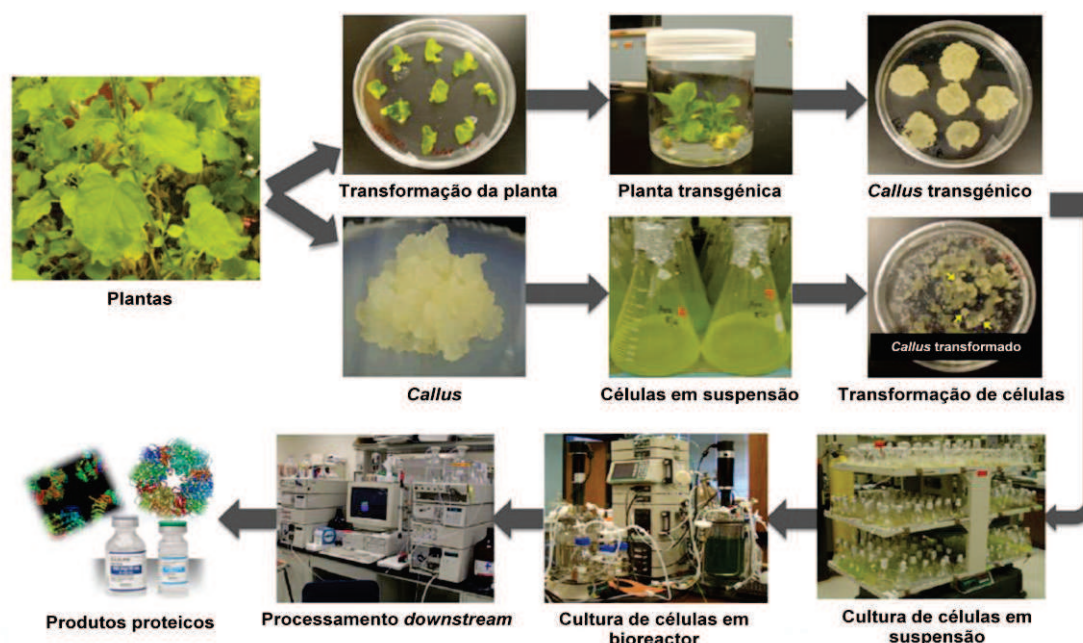


Figura 1.3 – Esquema representativo do processo de estabelecimento de culturas de células vegetais em suspensão para a produção de proteínas recombinantes (adaptado de Xu *et al.*, 2011).

1.4.2. Retenção vs. secreção, *downstream* e purificação proteica

Embora a elevada produtividade seja fundamental na tecnologia de culturas de células vegetais com o objectivo de comercialização, também a recuperação eficiente e purificação do produto recombinante é igualmente importante. A purificação proteica para aplicação terapêutica

representa o processo mais desafiante e dispendioso, em que a proteína da mais alta pureza (>99%) é requerida e os procedimentos de purificação devem seguir os rigorosos padrões regulamentares estabelecidos que regem a produção de biofármacos (Xu *et al.*, 2011).

Como já descrito acima (secção 1.2.5), nas células vegetais, as proteínas alvo podem ser retidas no interior das mesmas ou secretadas para o meio de cultura – característica especialmente importante nas culturas celulares em suspensão.

A secreção proteica refere-se ao transporte da proteína através da membrana plasmática e parede celular para o meio extracelular (James & Lee, 2001). Tal é obtido através de sequências-sinal que direccionam o transporte de proteínas para o lúmen do RE; após os fenómenos de *folding* e *assembly*, e a menos que a proteína possua um sinal de retenção no RE ou de transporte para outro organelo, esta abandona o RE e entra na via secretora, seguindo para o complexo de Golgi e espaço extracelular (Doran, 2000).

Como já referenciado, os sistemas de proteínas secretadas são vantajosos no processo de *downstream* e recuperação proteica, uma vez que duas etapas operacionais podem ser contornadas (disrupção celular e clarificação). Além disso, o meio de cultura, que é geralmente pobre em componentes fenólicos e outras substâncias oxidantes, entra no processo de purificação contendo uma percentagem bastante inferior de proteínas contaminantes e outros metabolitos relativos a extractos vegetais (Hellwig *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2011). Por outro lado, a proteína alvo está altamente diluída e, consequentemente, mais instável no meio de cultura, o que enfatiza a necessidade de técnicas de recuperação rápidas e eficientes a partir de grandes volumes de meio (Xu *et al.*, 2011).

No que concerne ao *downstream* de proteínas retidas no interior da célula, a vantagem assenta no pequeno volume de material de partida, bem como na, geralmente, elevada concentração da proteína recombinante nos compartimentos subcelulares. A principal desvantagem está essencialmente associada às substâncias proteolíticas e oxidantes derivadas do processo de disrupção celular (Hellwig *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2011). Assim, o processamento de *downstream* para proteínas retidas intracelularmente inicia-se com a disrupção celular e clarificação, seguindo-se os passos de captura e concentração proteica e, finalmente, a etapa de purificação; as proteínas secretadas avançam imediatamente para a fase de recuperação e concentração (Xu *et al.*, 2011).

A purificação contempla, normalmente, os métodos comuns de recuperação proteica usados noutras plataformas de produção. Técnicas cromatográficas incluindo cromatografias de troca iónica, afinidade, interações hidrofóbicas e de exclusão molecular são frequentemente utilizadas. O desenvolvimento do método, desde a selecção da matriz cromatográfica mais eficiente, ao seu arranjo numa ordem adequada e a avaliação da sua eficiência na recuperação do produto, está dependente das propriedades únicas da proteína alvo (tamanho molecular, carga, solubilidade e estabilidade) (Xu *et al.*, 2011). A utilização de *tags* de afinidade (GST, MBP e 6xHis) é igualmente habitual para a captura da proteína recombinante; contudo, estes *tags* podem requerer a sua remoção após a purificação de forma a restabelecer a estrutura/função nativa da proteína, tal como é também requerido para a distribuição do produto no mercado (Fischer *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2011).

Adicionalmente, podem ainda ser consideradas estratégias de purificação envolvendo membranas, como são a ultrafiltração, microfiltração e pervaporação (Xu *et al.*, 2011).

1.4.3. Instabilidade e degradação do produto

Como já mencionado, o nível de acumulação de produto é um parâmetro fundamental para os custos da produção proteica, sendo os baixos rendimentos associados à produção recombinante em sistemas vegetais uma importante limitação à exploração comercial destes. Assim, otimizar a acumulação de proteína recombinante nestes sistemas de expressão afigura-se como um dos maiores obstáculos que afectam o desenvolvimento futuro desta tecnologia (Doran, 2006).

Num qualquer momento, a quantidade de proteína recombinante presente num tecido vegetal reflecte um balanço entre a síntese proteica e a perda ou degradação proteica; como tal, a degradação proteica desempenha um importante papel na determinação do rendimento total das proteínas recombinantes nas células vegetais (Doran, 2006). A degradação, ou perda, de produto proteico após a sua síntese pode ocorrer por inúmeros mecanismos, incluindo quebra enzimática, agregação, desnaturação e adsorção (James & Lee, 2001).

No que respeita à produção proteica no interior das células e nos tecidos vegetais, tem-se mostrado comum para diversas espécies hospedeiras a degradação da proteína recombinante e formação de pequenos fragmentos proteicos (usualmente detectados através da análise de *immunoblot*). As proteases têm a importante função de degradar proteínas incorrectamente processadas e, como tal, a possibilidade destas atacarem proteínas recombinantes pode reflectir uma síntese ou *assembly* incorrectos das últimas. Mais, as diferenças entre os N-glicanos de plantas e animais, que afectam o *folding* e a estrutura das proteínas recombinantes, podem tornar as proteínas produzidas em plantas mais susceptíveis à actividade proteásica do que os seus homólogos produzidos em animais (Doran, 2006).

Por outro lado, no interior das células e dos tecidos, a degradação proteolítica das proteínas recombinantes pode também estar associada a localizações subcelulares ou organelos específicos (Doran, 2006).

Como anteriormente referido, a estratégia de retenção da proteína no RE pode ser usada para minimizar a degradação proteica, fornecendo um ambiente relativamente protector às proteínas, proporcionando o seu *folding* e *assembly* correctos. Para além disso, as proteínas podem ser direccionadas para órgãos específicos da planta (sementes, por exemplo), que contêm inibidores de proteases endógenos. Alternativamente, uma potencial abordagem respeita à co-expressão de inibidores de proteases com a proteína recombinante. Nas culturas de tecidos vegetais, estes inibidores de proteases podem simplesmente ser adicionados ao meio de cultura, assumindo que estes conseguem aceder ao interior da célula (Doran, 2006).

Relativamente à secreção de proteínas para o meio de cultura, e apesar das inúmeras vantagens já apresentadas, esta estratégia acarreta a perda substancial de proteína recombinante. Assim, a ausência de detecção de proteína no meio de cultura não significa necessariamente a retenção intracelular da mesma ou a falta de secreção, o produto secretado pode ter sido degradado

ou de alguma forma perdido. Por outro lado, os níveis de proteína recombinante no meio podem ser significativamente afetados pela irreversível adsorção à superfície do frasco da cultura em suspensão, especialmente para proteínas de elevada massa molecular (Doran, 2006).

Para além da estratégia de adição de inibidores de proteases, vários agentes estabilizadores de proteínas têm sido aplicados a culturas vegetais prevenindo a perda de proteína do meio de cultura (por exemplo, albumina de soro bovino, gelatina, polietilenoglicol, polivinilpirrolidona, dimetilsulfóxido); no geral, estes protegem a proteína da degradação proteolítica, previnem a precipitação da mesma e bloqueiam interações inespecíficas com a superfície de vidro ou plástico do frasco de cultura (Doran, 2006; Hellwig *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2011). Uma abordagem alternativa recente diz respeito à recuperação proteica *in situ*, na qual o produto é removido do meio antes de poder ser degradado ou de ficar adsorvido (Doran, 2006; Xu *et al.*, 2011).

1.5. *Medicago truncatula* como emergente sistema de expressão

Diversas plantas modelo têm sido usadas em *Molecular Farming* devido à sua fácil transformação e manipulação em laboratório (por exemplo, tabaco e *Arabidopsis thaliana*). Recentemente, a espécie leguminosa *Medicago truncatula* surgiu como um promissor sistema alternativo de produção proteica, apresentando vantagens significativas sobre outras plantas (Abranches *et al.*, 2005). Também sobre a espécie relacionada *Medicago sativa* (comumente conhecida como alfalfa), para a qual existem já vários relatórios da sua utilização para produzir proteínas recombinantes, descrevendo os numerosos benefícios desta espécie como sistema de produção (Abranches *et al.*, 2005; D'Aoust *et al.*, 2004; www.medicago.com).

As leguminosas são uma ampla família de plantas que, devido à sua capacidade de fixação de azoto atmosférico, são componentes essenciais de diferentes ecossistemas terrestres e uma fonte de proteína na dieta humana, alimentação para animais e óleo (Abranches *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2004).

A *Medicago truncatula* é a espécie modelo para esta família (Cook, 1999), é autogâmica e diplóide e apresenta um genoma relativamente pequeno e completamente sequenciado; este genoma é altamente conservado entre *M. truncatula*, alfalfa e ervilha e moderadamente conservado entre *M. truncatula* e soja, fornecendo o potencial para a transferência de informação genética em melhoramento de culturas. Do ponto de vista agronómico, é uma planta com curto ciclo de vida (cerca de 3 meses) (Abranches *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2004). Por outro lado, foi já reportada a transformação e regeneração de *M. truncatula* com elevada eficiência, por Araújo *et al.* (2004), bem como a produção em níveis elevados da proteína fitase recombinante. Recentemente, foram também estabelecidas e caracterizadas culturas de células em suspensão de *Medicago truncatula* produzindo altos níveis de fitase recombinante (González-Melendi *et al.*, 2009; Pires *et al.*, 2008).

1.6. Prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS)

A prostaglandina D sintase (PGDS) é o enzima responsável pela isomerização da prostaglandina H₂ (PGH₂), precursor comum de vários prostanóides, a prostaglandina D₂ (PGD₂) (Figura 1.4), que é a principal prostaglandina produzida no cérebro humano e sistema nervoso central (Urade & Hayaishi, 2000).

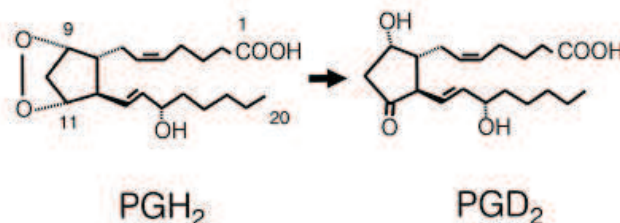


Figura 1.4 – Isomerização de PGH₂ a PGD₂ catalisada pelo enzima L-PGDS (Urade & Hayaishi, 2000).

Dois tipos distintos de PGDS foram já purificados e caracterizados: a PGDS do tipo lipocalina e do tipo hematopoiética. Estas apresentam bastantes diferenças entre si, no que respeita às propriedades catalíticas, sequência de aminoácidos, estrutura terciária, origem evolucionária, estrutura genética, localização cromossomal, localização subcelular, distribuição nos tecidos e ainda relevância funcional (Urade & Eguchi, 2002).

A prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS) foi recentemente identificada como sendo a mesma proteína conhecida como β -trace, a principal proteína do fluido cerebrospinal. É uma proteína bifuncional, sendo que para além de catalisar a síntese da PGD₂ na célula, como proteína secretada funciona como transportador de pequenas moléculas lipofílicas, pelo que pertence à família das proteínas lipocalinas (Urade & Hayaishi, 2000; Urade & Eguchi, 2002).

A proteína humana L-PGDS é uma proteína monomérica, com 183 a 194 aminoácidos, altamente N-glicosilada (com dois locais de N-glicosilação: Asn²⁹ e Asn⁵⁶), muito estável, com uma M_r que varia entre 20000 a 31000 (dependendo do tamanho dos oligossacáridos) e de ponto isoelectrico a oscilar entre 5,0 e 8,0, aproximadamente (Lescuyer *et al.*, 2005; Urade & Hayaishi, 2000). Para além de presente no sistema nervoso central, órgãos genitais masculinos de vários mamíferos e no coração humano, é igualmente secretada para diversos fluidos corporais (fluido cerebrospinal, fluido ocular, plasma seminal, plasma e urina). Uma vez presente nestes vários fluidos, a concentração de L-PGDS pode ser um marcador clínico útil para várias doenças (Lescuyer *et al.*, 2005; Urade & Eguchi, 2002; Urade & Hayaishi, 2000).

Por outro lado, esta está envolvida em variadíssimas funções fisiológicas e patológicas. No cérebro, está relacionada com o controlo da nocicepção e do sono *non-rapid eye movement* (Lescuyer *et al.*, 2005; Jordan *et al.*, 2004) e aparenta estar envolvida no início e progressão da doença de Alzheimer (Kanekiyo *et al.*, 2007). A sua deficiência induz obesidade e facilita a aterosclerose, provavelmente através da regulação de respostas inflamatórias (Tanaka *et al.*, 2009); a L-PGDS protege igualmente contra a hipoxemia ou isquemia/lesão por reperfusão (Kumasaka *et al.*, 2009) e apresenta um papel crucial na espermatogénese (Wilhelm *et al.*, 2007). Dado o elevado

número de potenciais aplicações deste enzima, a produção recombinante de L-PGDS pode ser uma nova e importante linha de investigação para o uso putativo desta proteína em terapêutica e diagnóstico.

1.7. Objectivos

As culturas de células vegetais em suspensão surgiram como plataforma alternativa viável aos sistemas convencionais, particularmente aos baseados em culturas de células de mamífero bem estabelecidos, para a produção em larga escala de proteínas recombinantes para aplicação terapêutica. Assim, para além de uma transferência eficaz do transgene que codifica para uma proteína específica para as células vegetais, é igualmente imperativo otimizar os pontos cruciais relacionados com a expressão desta proteína, bem como com o seu processo de *downstream* e purificação. É neste âmbito que se insere este projecto, que visa o estabelecimento de culturas celulares em suspensão de *Medicago truncatula* expressando o enzima humano prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (β -trace). Com este propósito, foram directamente transformadas culturas *wild-type*, o que respeita a um trabalho inovador uma vez que não existe nenhum protocolo prévio relativo à transformação directa desta espécie vegetal. Depois de estabelecidas as culturas transgénicas, os principais objectivos deste projecto foram a confirmação da produção da proteína em estudo e, essencialmente, a purificação da mesma, sendo abordadas diversas estratégias distintas. Desta forma, procede-se a uma avaliação do potencial de culturas celulares em suspensão de *Medicago truncatula* para a produção de proteínas recombinantes e, mais concretamente, do comportamento da proteína em estudo, sua estabilidade, rendimento e recuperação.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material Vegetal

Plantas transgênicas de *Medicago truncatula* expressando de forma estável β -trace recombinante (na forma secretada) foram anteriormente obtidas por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e estão desde logo disponíveis em laboratório.

2.2. Transformação de culturas *wild-type* de *Medicago truncatula*

Em laboratório existia já o plasmídeo de interesse contendo a sequência codificadora da β -trace secretada, previamente extraído de *Escherichia coli*. O vector de expressão pTRA-BT-AH, anteriormente construído em laboratório, contém o T-DNA para a β -trace na forma secretada (Figura 2.1).

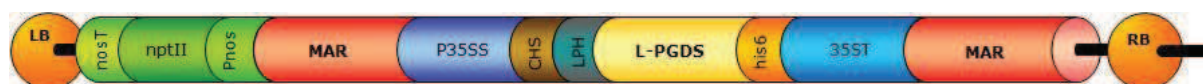


Figura 2.1 – T-DNA de L-PGDS na forma secretada.

O T-DNA, flanqueado pelo *left* (LB) e *right border* (RB), contém o cDNA que codifica para a L-PGDS e que está sob o controlo do promotor constitutivo 35SS (P35SS), uma versão melhorada do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor; a montante do cDNA encontra-se uma região não traduzida e estabilizadora do RNA mensageiro (CHS), bem como um péptido sinal de murino (LPH), que foi otimizado para plantas. A jusante do cDNA da β -trace está um *tag* de fusão em C-terminal de seis resíduos de histidina (his6) e a sequência terminadora (35ST). Existem igualmente regiões MAR (*Matrix Attachment Regions*), que evitam os fenómenos de silenciamento e estabilizam a expressão do gene. No T-DNA está ainda presente a cassette de resistência à canamicina com o gene *nptII*.

O plasmídeo pTRA-BT-AH foi utilizado para transformar culturas *wild-type* de *Agrobacterium tumefaciens*, seguindo-se a transformação das culturas *Medicago truncatula* A17, pelo método de co-cultura.

Note-se que toda a manipulação tanto de plasmídeo como de culturas de *Agrobacterium tumefaciens* e de células vegetais descrita abaixo foi realizada numa câmara de fluxo laminar, mantendo todas as condições de esterilidade.

2.2.1. Preparação de culturas competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Em placas com meio *Yeast Extract Broth* contendo MgSO_4 (YEB⁺; em anexo) suplementado com canamicina (Kan, 25mg/L) e rifampicina (Rif, 50mg/L), fez-se um riscado com *Agrobacterium wild-type* GV3101 (pMP90RK), tendo ficado a incubar 48 horas, a 27°C. Selecionou-se uma colónia

isolada e transferiu-se para 15mL do mesmo meio líquido (incubação de 48 horas, a 180rpm, 27°C). Centrifugou-se a cultura durante 20 minutos, a 3750rpm, 4°C (Beckman Allegra X-12R, rotor SX4750A), tendo-se ressuspendido o *pellet* obtido em 2mL do mesmo meio e adicionado igual volume de *Glycerol Stock Media* (GSM) estéril (em anexo). Preparada a cultura de *Agrobacterium* competente, aliquotou-se, congelou-se imediatamente em azoto líquido e guardou-se a -80°C.

2.2.2. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Para a transformação do *Agrobacterium* utilizou-se o método *freeze-thaw*. Para tal, adicionou-se 5µL do plasmídeo pTRA-BT-AH (já extraído de *E. coli*) a uma alíquota de *Agrobacterium* competente (100µL), em gelo. Seguiu-se um passo de 5 minutos em azoto líquido, posterior incubação a 37°C durante o mesmo tempo e, no final, volta a ser colocado em gelo. Adicionou-se 1mL de meio líquido YEB⁺ (sem antibióticos) e incubou-se 1 hora, a 27°C, 110rpm. 20µL deste volume foi inoculado numa placa com meio YEB⁺-Rif-Kan-Carbenicilina (Carb, 50mg/L) (as concentrações finais de antibióticos são sempre as mesmas – em anexo) e incubado 48 horas a 27°C, de forma a permitir o crescimento de colónias transformadas.

2.2.3. PCR para verificação da presença do transgene

Após 48 horas, testou-se a presença do transgene em colónias isoladas obtidas na placa deixada a incubar, através da técnica de PCR.

Começou-se por preparar uma placa com meio YEB⁺-Rif-Kan-Carb (*Master Plate*) e a mistura reaccional (*Master Mix*). A *Master Mix* foi preparada, em gelo, de acordo com a Tabela 2.1, tendo em conta que o volume final da mesma varia consoante o número de colónias isoladas a ser testadas, mais um controlo positivo e um negativo, sendo necessários 10µL de mistura para cada colónia/controlo. Os *primers* utilizados nesta *Master Mix* e que flanqueiam a sequência alvo, ligam-se na zona do promotor e do terminador do gene para a β-trace.

Tabela 2.1 – Concentrações finais a utilizar dos vários reagentes para preparação da *Master Mix*. O volume final da solução é acertado com água estéril.

Reagente	C _{stock}	C _{final}
Tampão (Abgene)	10x	1x
MgCl ₂ (Abgene)	25mM	1,5mM
dNTPs	10mM	0,4mM
Primer 3'	10µM	0,2µM
Primer 5'	10µM	0,2µM
Taq polimerase (Abgene)	5U/µL	0,035U/µL

Depois de preparada, a *Master Mix* foi dividida pelos microtubos para PCR estéreis (10 μ L/microtubo). Ao controlo positivo adicionou-se ainda 0,5 μ L de plasmídeo pTRA-BT-AH. Posteriormente, as colónias isoladas foram picadas na *Master Plate* (devidamente dividida por zonas identificadas) e transferidas para os microtubos respectivos. A *Master Plate* ficou em incubação a 27°C durante um período máximo de 48 horas, de forma a garantir que possíveis colónias positivas sejam mantidas. Os tubos foram introduzidos no termociclador (Mastercycle Eppendorf) e submetidos a um programa que contempla 40 ciclos reaccionais (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Programa utilizado no termociclador Mastercycle Eppendorf. As 3 etapas destacadas repetem-se por 40 ciclos.

<i>Lid</i>	105°C
5min	95°C
30seg	95°C
30seg	54°C
40seg	72°C
10min	72°C
<i>Hold</i>	4°C

Terminado o programa, preparou-se um gel de agarose (0,8%) em tampão TAE (1x; em anexo) no qual serão aplicadas as amostras resultantes do PCR para serem submetidas a electroforese. A 30mL de gel previamente preparado adicionou-se 1,5 μ L de Brometo de Etídeo (Sigma-Aldrich) e depositou-se no berço. Após a polimerização do gel, este foi transferido para o sistema de corrida horizontal (Bio-Rad Mini-Sub Cell GT) e imerso em TAE (Figura 2.2).

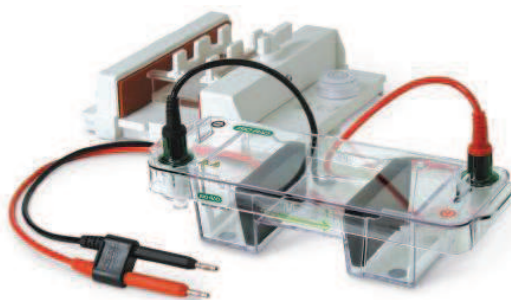


Figura 2.2 – Sistema de electroforese horizontal Bio-Rad Mini-Sub Cell GT.

As amostras foram preparadas com Orange G (10x concentrado) e aplicadas nos poços (cerca de 11 μ L por poço); num deles são carregados 5 μ L de marcador 1Kb⁺ (Invitrogen). Fechado o sistema, é aplicada uma voltagem de 90V e uma amperagem de 400mA, durante aproximadamente 30 minutos. O gel foi revelado num sistema de visualização de géis (Gel Doc XR+) através de incidência de luz ultravioleta.

2.2.4. Aliquotagem de *Agrobacterium tumefaciens* BT-AH

Seleccionada uma colónia positiva, esta foi transferida para 10mL de meio YEB⁺-Rif-Kan-Carb (incubação de 72 horas, a 110rpm, 27°C). Centrifugou-se a cultura durante 15 minutos a 4000g, 26°C, ressuspendeu-se o *pellet* obtido num pequeno volume do mesmo meio líquido e per fez-se para um volume final de 70mL, aproximadamente (incubação de 24 horas a 110rpm, 27°C). Seguiu-se nova centrifugação durante 15 minutos a 4000g, 26°C, tendo-se ressuspendido o *pellet* em 2mL de meio YEB⁺ (sem antibióticos) e adicionado igual volume de GSM estéril. Fez-se alíquotas de 500 µL, congelou-se imediatamente em azoto líquido e guardou-se a -80°C.

2.2.5. Co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens* BT-AH

Em placas com meio YEB⁺-Rif-Kan-Carb fez-se um riscado com *Agrobacterium* BT-AH proveniente de uma alíquota preparada e deixou-se em incubação durante 48 horas a 27°C. A partir de um novo PCR realizado a colónias isoladas obtidas (ver secção 2.2.3), seleccionaram-se as colónias positivas que foram transferidas para 20mL de meio líquido YEB⁺-Rif-Kan-Carb (incubação *overnight* a 27°C, 110rpm). No dia seguinte, mediu-se a OD₆₀₀ das várias culturas líquidas (Beckman DU-70); aquelas que atingiram o valor de 1,5 foram utilizadas para realizar a co-cultura com as culturas celulares *wild-type* de *Medicago truncatula* (A17).

A um volume de 30mL de cultura celular *wild-type* de *M. truncatula*, adicionou-se 10mL de cultura de *A. tumefaciens* transformada (incubação no escuro durante 48 horas a 25°C, 130rpm). Passadas 48 horas, deixou-se assentar por gravidade as células em co-cultura, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se igual volume de meio líquido Murashige & Skoog (MS) suplementado com hormonas (em anexo). Este passo de lavagem das células foi repetido, sendo que à terceira lavagem se adicionou 40mL de meio MS suplementado com hormonas e os antibióticos canamicina (25mg/L) e timentina (500mg/L).

Estas culturas líquidas em suspensão foram deixadas no escuro, num agitador (Innova 4900), a 125rpm e a 27°C, tendo-se mudado o meio líquido suplementado com os dois antibióticos passado uma semana e, novamente, passado outra semana, sendo que desta vez se eliminou a timentina; a partir daqui, a mudança para meio fresco fez-se apenas de 15 em 15 dias.

2.3. Estabelecimento de culturas celulares em suspensão a partir de planta *M. truncatula* transformada

Paralelamente, foram igualmente estabelecidas culturas em suspensão a partir do material vegetal já existente, ou seja, de plantas *Medicago* estáveis expressando β-trace na forma secretada (secção 2.1).

Destas plantas transgénicas foram destacadas e ligeiramente golpeadas algumas folhas e cortadas pequenas porções de caule, tendo todos os explantes sido colocados em contacto com meio sólido MS suplementado com hormonas (em anexo), para indução de *callus* no escuro e à

temperatura ambiente. Quando, empiricamente, se obteve *callus* suficiente (após pouco mais de um mês), este foi levemente cortado com o auxílio de um bisturi e disperso em meio líquido MS suplementado com hormonas (cerca de 30mL) em frascos *Erlenmeyer*. Estas culturas foram igualmente mantidas no escuro, num agitador (Innova 4900), a 125rpm e a 27°C, sendo repicadas de forma empírica, aproximadamente de mês a mês, para meio fresco de igual composição.

2.4. Verificação da presença da β -trace recombinante

2.4.1. Dot-Blot

As amostras proteicas foram previamente extraídas de agregados celulares (secção 2.8) ou precipitadas do meio de cultura (secção 2.9.1).

Numa membrana de nitrocelulose (Hybond-C, 0,45mincron, Amersham) desenhou-se uma grelha delimitadora das zonas dos *blots*. Nas diversas zonas, pipetou-se lentamente 4 μ L dos extractos proteicos e deixou-se secar durante 10 minutos. Incubou-se a membrana numa solução de bloqueio com 5% de BSA (Sigma) em PBS-T (em anexo), durante 40 minutos à temperatura ambiente, com agitação suave.

Lavou-se a membrana por 3 vezes, num pequeno volume de PBS-T, durando 5 minutos cada lavagem. Posteriormente, incubou-se numa solução de anticorpo primário anti-L-PGDS (Abcam Ab61866) na diluição de 1:200 em PBS-T, para uma concentração final de 2 μ g/mL, durante 40 minutos, à temperatura ambiente e com agitação. Seguiram-se 3 novas lavagens de 5 minutos com PBS-T. A membrana foi então colocada em solução de anticorpo secundário anti-soro de coelho (Sigma A3687), acoplado a fosfatase alcalina, numa diluição de 1:4000 em PBS-T, durante 40 minutos, à temperatura ambiente, com agitação. Lavou-se novamente a membrana com PBS-T, 3 vezes durante 5 minutos.

Realizou-se então a detecção colorimétrica da β -trace, utilizando uma solução de 2mL de tampão NBT/BCIP (em anexo), 13,2 μ L de NBT (Promega) e 6,6 μ L de BCIP (Promega). Esta foi espalhada por toda a membrana e mantida no escuro durante toda a reacção. Depois de visíveis os *dots*, a reacção foi parada com água desionizada.

2.4.2. Western-Blot

O meio de cultura recolhido para análise por *Western-Blot* é obtido através de um passo prévio de filtração, como descrito na secção 2.7.

2.4.2.1. Preparação das amostras

As amostras de meio de cultura celular foram preparadas em tampão de amostra (em anexo) numa razão de 1:4 (1 μ L de amostra:4 μ L de tampão de amostra 4x concentrado). Depois de um *spin down* (centrífuga 5415 D, Eppendorf), são desnaturadas a 100°C (AccuBlock Digital Dry Bath, Labnet

International, Inc.) durante 10 minutos, novo *spin down* para sedimentação de alguns precipitados que se possam formar durante a incubação a 100°C, e aplicam-se no gel.

Quando as amostras foram previamente precipitadas em etanol absoluto (secção 2.9.1), o *pellet* é ressuspendido em tampão de amostra (1x), incubado a 100°C durante 10 minutos, seguindo-se a aplicação no gel.

2.4.2.2. SDS-PAGE

Depois de montado o sistema de preparação de géis (Bio-Rad Mini – Protean 3; Figura 2.3), começou-se por preparar o gel de resolução (12,5% de acrilamida), de acordo com a Tabela 2.3, que foi aplicado entre os vidros até uma altura aproximada de 6cm. Por cima do gel, e cobrindo o restante volume, foi colocado um pequeno volume de isopropanol, de modo a garantir uma polimerização plana. Durante aproximadamente 45 minutos, deixou-se o gel polimerizar. Depois de removido todo o isopropanol, preparou-se o gel de concentração (Tabela 2.3) que foi adicionado até perfazer a restante altura dos vidros e colocaram-se os pentes. Uma vez mais, deixou-se polimerizar (cerca de 1 hora).

Tabela 2.3 – Preparação dos géis de resolução (12,5% de acrilamida) e de concentração, para um volume final de 10 e 5mL, respectivamente (isto é, dois minigéis).

Solução	Gel de resolução (mL)	Gel de concentração (mL)
Água destilada	3,98	2,82
Tampão de concentração	-	1,25
Tampão de resolução	1,25	-
10% SDS (Duchefa Biochemie)	0,1	0,05
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8) (Bio-Rad)	4,2	0,625
TEMED (Sigma)	0,005	0,005
1,5% Persulfato de amónio (Merck)	0,5	0,25

Após a montagem do sistema de corrida dos géis, adiciona-se tampão de corrida até cobrir totalmente os eléctrodos. As amostras são carregadas nos poços (cerca de 30µL por poço) com o auxílio de uma seringa de 50µL (Hamilton), sendo que num deles é aplicado cerca de 3µL de marcador de massa molecular *Low Range* (Bio-Rad). Depois de fechado o sistema, é aplicada uma voltagem de 180V e uma amperagem constante de 30mA, durante aproximadamente 90 minutos.



Figura 2.3 – Sistema de electroforese Bio-Rad Mini – Protean 3.

2.4.2.3. Coloração de gel com azul de Coomassie

Um dos géis é deixado a corar *overnight* em azul de Coomassie (em anexo), com agitação ligeira. Seguem-se várias passagens do gel em solução descorante (em anexo) durante alguns minutos, com agitação ligeira, até serem observáveis bandas coradas.

2.4.2.4. Coloração de gel com Nitrato de Prata

Por vezes, e alternativamente à coloração com Coomassie, realizou-se coloração do gel com nitrato de prata, que sendo um método mais sensível detecta menores quantidades de proteína.

O gel é deixado pelo menos 1 hora na solução 1, seguindo-se 3 lavagens de 20 minutos com a solução 2; passa-se para o pré-tratamento de apenas 1 minuto na solução 3 e depois 3 lavagens de 20 segundos em água destilada; de seguida, o gel passa por impregnação de 20 minutos na solução 5 e, novamente, 3 lavagens de 20 segundos em água destilada; finalmente, é deixado na solução 7 o tempo suficiente para a observação das bandas, sem que fique com demasiados borrões. A reacção é parada com a solução 9 (a composição destas soluções encontra-se em anexo).

2.4.2.5. Transferência semi-seca para membrana de nitrocelulose

O segundo gel é utilizado para fazer a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. Colocaram-se dois papéis de filtro extra-grossos (Bio-Rad), uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C, 0,45mícron, Amersham) e o gel em tampão de transferência de proteínas (em anexo), durante alguns minutos. Montou-se a *sandwich* no sistema semi-seco (Trans-Blot Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad), como mostra a Figura 2.4. Fechado o sistema, aplicou-se uma voltagem constante de 16V e amperagem de 200mA, durante 25 minutos.

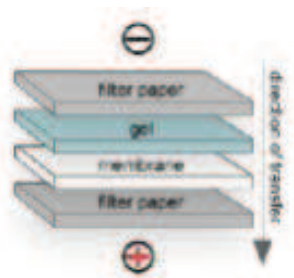


Figura 2.4 – Esquema de montagem de *sandwich* no sistema de transferência semi-seca.

2.4.2.6. Imunodeteção da β -trace recombinante

Realizada a transferência proteica para a membrana, esta começou por ser incubada numa solução proteica de bloqueio com 5% de leite em pó magro (Nestlé) e 3% de BSA (Sigma) em PBS-T, durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação suave.

Seguiram-se 3 lavagens da membrana num pequeno volume de PBS-T, durando 5 minutos cada lavagem. Posteriormente, incubou-se numa solução de anticorpo primário anti-L-PGDS (Abcam Ab61866) na diluição de 1:200 em PBS-T, para uma concentração final de 2 $\mu\text{g/mL}$, durante 40 minutos, à temperatura ambiente e com agitação; de seguida, *overnight* a 4°C, sem agitação.

No dia seguinte, repetiram-se as 3 lavagens de 5 minutos com PBS-T. A membrana foi então colocada em solução de anticorpo secundário anti-soro de coelho (Sigma A3687), acoplado a fosfatase alcalina, numa diluição de 1:4000 em PBS-T, durante 40 minutos, à temperatura ambiente, com agitação. Lavou-se novamente a membrana com PBS-T, 3 vezes durante 5 minutos.

Realizou-se então a detecção colorimétrica da β -trace, utilizando uma solução de 2 mL de tampão NBT/BCIP, 13,2 μL de NBT (Promega) e 6,6 μL de BCIP (Promega). Esta foi espalhada por toda a membrana e mantida no escuro durante toda a reacção. Depois de visíveis as bandas coradas, parou-se a reacção com água desionizada.

2.5. Purificação da β -trace recombinante

O meio de cultura recolhido para as várias estratégias de purificação da β -trace é obtido através de um passo prévio de filtração, como descrito na secção 2.7.

2.5.1. Cromatografia de Afinidade com Ião Metálico Imobilizado (IMAC)

A resina utilizada foi a resina de agarose Ni-NTA (Qiagen).

Começou-se por centrifugar (centrífuga 5415 D, Eppendorf) durante cerca de 3 minutos a 13000rpm os 200 μL de volume total de resina retirada. Depois de retirado o sobrenadante, a resina (cerca de 100 μL) é lavada em tampão de equilíbrio PBS pH 7,6 (1x) (em anexo), centrifugando-se novamente nas mesmas condições e desprezando-se o sobrenadante. Este passo de lavagem foi repetido com novo volume de tampão. Já com a resina equilibrada em tampão, esta foi adicionada à amostra a purificar, ficando em incubação no mínimo 2 horas a 4°C, com agitação. Por várias vezes,

esta incubação ficou *overnight*. Seguiu-se a aplicação da amostra na coluna cromatográfica (Bio-Rad) (montada de acordo com a Figura 2.5) e recolha da fracção não ligada (*flow-through*), por aplicação de vácuo. Depois de lavada a resina com novo volume de tampão de equilíbrio, a eluição da fracção ligada (eluado) foi realizada com uma solução de Imidazole (250 e/ou 400mM) em PBS pH 4,5. Num último passo, foi por vezes aplicado um volume de solução de EDTA 0,5M pH 8,0 para uma eluição final.

As fracções resultantes são guardadas a -20°C.



Figura 2.5 – Esquema de montagem da coluna cromatográfica para aplicação de vácuo.

2.5.2. Cromatografia de Troca Iónica

Realizaram-se cromatografias tanto com a resina de troca aniónica DEAE-Sepharose (Pharmacia), como com a resina de troca catiónica SP-Sepharose (Pharmacia). Foram testadas diferentes condições de pH, tendo-se para tal utilizado os seguintes tampões de equilíbrio: Acetato de sódio 50mM pH 4,5 (5x), PBS pH 7,6 (10x) e Glicina-NaOH 50mM pH 9,6.

Nos casos de se ter trabalhado em condições ácidas ou básicas, começou-se por alterar o valor de pH da amostra a purificar, por adição do tampão de equilíbrio adequado.

Lavou-se o volume pretendido de resina (normalmente, 1mL), de acordo com o explicado na secção anterior, tendo igualmente em atenção o tampão de equilíbrio usado consoante as condições de pH pretendidas. Já com a resina equilibrada em tampão, esta foi adicionada à amostra, ficando em incubação cerca de 3 horas, em gelo, com agitação.

Seguiu-se a aplicação da amostra na coluna cromatográfica (Bio-Rad) e recolha da fracção não ligada. Depois de lavada a resina com novo volume de tampão utilizado, foi aplicada uma solução salina de NaCl (500 e/ou 1000mM) preparada no tampão de equilíbrio em uso, que fica em incubação na coluna durante cerca de 10 minutos, com agitação ligeira. Só depois se procedeu à eluição da fracção ligada.

As fracções resultantes são guardadas a -20°C.

2.6. Digestão com enzima PNGase A

As amostras foram previamente precipitadas com etanol a -20°C (como descrito na secção 2.9.1). Os *pellets* obtidos foram ressuspensos em tampão citrato 100mM pH 5 (com EDTA 10mM), seguindo-se a adição do enzima PNGase A (N-Glycosidase A EC 3.5.1.52 5mU (100µL) Roche), que fica em incubação durante 24 horas a 37°C. As amostras ficaram assim prontas para seguir para *Western-Blot*, bastando juntar o tampão de amostra (4x) e seguir com o protocolo indicado em 2.4.2.

2.7. Filtração a vácuo das culturas celulares

Antes de se proceder tanto à imunodeteção da β -trace nos meios de culturas em suspensão, como à purificação da mesma, estas foram submetidas a filtração a vácuo utilizando papel de filtro 90 mm *qualitative medium speed* (Labbox), obtendo-se meio de cultura limpo de agregados celulares.

2.8. Extracção proteica de agregados celulares

Da cultura em suspensão, retirou-se uma alíquota (*eppendorf*) contendo agregados celulares. Depois de feito um *spin down*, desprezou-se o sobrenadante. Quando necessário, repetiu-se os passos anteriores para o mesmo *eppendorf* de modo a recolher mais células. Passou-se o *eppendorf* por azoto líquido e macerou-se o extracto celular com o auxílio de uma palheta. Adicionou-se tampão de extracção (em anexo) na proporção 1µL de tampão de extracção:1mg de células e centrifugou-se (centrífuga Biofuge 28RS, Heraeus Sepatech) durante 20 minutos a 14000g, 4°C. Recolheu-se o sobrenadante para outro *eppendorf* e guardou-se a -20°C.

2.9. Concentração das amostras

Por vezes, foi necessário concentrar as amostras de meio de cultura em suspensão, através da utilização de dispositivos de ultrafiltração e/ou precipitação com etanol.

2.9.1. Precipitação com etanol absoluto a -20°C

As proteínas em solução no meio de cultura foram precipitadas adicionando-se à amostra 4 volumes de etanol absoluto a -20°C e guardando-se também a -20°C, durante pelo menos 2 horas. Após uma centrifugação (centrífuga 5415 D, Eppendorf) de 10 minutos a 10000g, à temperatura ambiente, desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* foi seco com o auxílio de vácuo e ressuscitado no tampão adequado: tampão PBS pH 7,6 (1x) para *Dot-Blot* e tampão de amostra (1x) para *Western-Blot*.

2.9.2. Ultrafiltração com dispositivos Amicon

Colocou-se a amostra no topo do dispositivo Amicon com limite 10kDa (Millipore), num volume máximo de 15mL. Centrifugou-se (centrífuga Allegra X-12R) durante 40 minutos a 3000rpm, 26°C. Após a centrifugação, retirou-se imediatamente a amostra concentrada do topo do dispositivo e guardou-se a -20°C.

Por vezes, as proteínas da amostra concentrada foram posteriormente precipitadas com etanol absoluto a -20°C.

3. Resultados e Discussão

3.1. Estabelecimento de culturas celulares em suspensão de *Medicago truncatula*

Num primeiro ponto, e com o objectivo de se estabelecerem culturas celulares em suspensão de *Medicago truncatula* expressando o enzima β -trace na forma secretada, realizou-se a transformação directa mediada por *Agrobacterium* de culturas celulares A17 (*wild-type*). Em paralelo, foram igualmente estabelecidas culturas a partir de planta transgénica já existente.

3.1.1. Transformação de culturas *wild-type* de *Medicago truncatula*

Inicialmente, foram preparadas culturas competentes de *Agrobacterium tumefaciens*, que foram transformadas com o plasmídeo pTRA-BT-AH que contem o gene para β -trace na forma secretada, de acordo com as secções 2.2.1 e 2.2.2 dos Materiais e Métodos.

Na preparação de culturas competentes de *Agrobacterium*, o meio de cultura foi suplementado com dois antibióticos de selecção: a canamicina, que permite seleccionar as transformadas com a região T-DNA, ao mesmo tempo que a rifampicina selecciona a estirpe de *Agrobacterium* utilizada (GV3101). Após a transformação das culturas de *Agrobacterium*, foi igualmente adicionado ao meio de cultura o antibiótico carbenicilina, que permite seleccionar o plasmídeo *helper*, uma vez que a transformação é feita através do sistema binário.

Antes destas culturas transformadas seguirem para aliquotagem para utilização posterior, realizou-se um PCR às mesmas para verificação da presença e integridade do transgene.

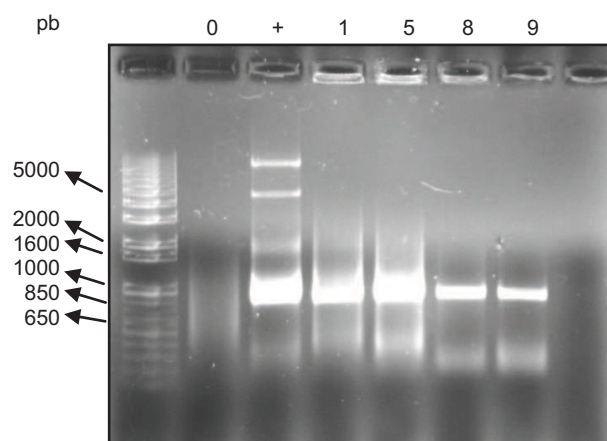


Figura 3.1 – Gel de electroforese resultante do PCR a colónias isoladas de *Agrobacterium tumefaciens* transformado com o plasmídeo pTRA-BT-AH realizado antes de aliquotagem. As pistas numeradas 1, 5, 8 e 9 respeitam a quatro colónias isoladas; as pistas 0 e + correspondem aos controlos negativo (sem bactéria e sem plasmídeo) e positivo (sem bactéria, apenas plasmídeo), respectivamente.

Por análise do gel de electroforese resultante do PCR (Figura 3.1), verificou-se que nas pistas 1, 5, 8 e 9 é visível uma banda de forte intensidade (cerca de 700pb) que, por comparação com o

controlo positivo (sem bactéria, apenas plasmídeo), permite concluir que se trata do fragmento de DNA amplificado no PCR (sequência alvo).

Assim, as quatro colónias testadas são positivas para a sequência alvo do plasmídeo de interesse, possuindo o gene para a β -trase secretada. Como tal, foram todas utilizadas para aliquotagem (secção 2.2.4).

Seguiu-se a transformação das culturas *wild-type* de *Medicago truncatula* com o *Agrobacterium* transformado previamente aliquoteado. Antes, foi necessária nova verificação da presença do transgene através de PCR a colónias isoladas obtidas.

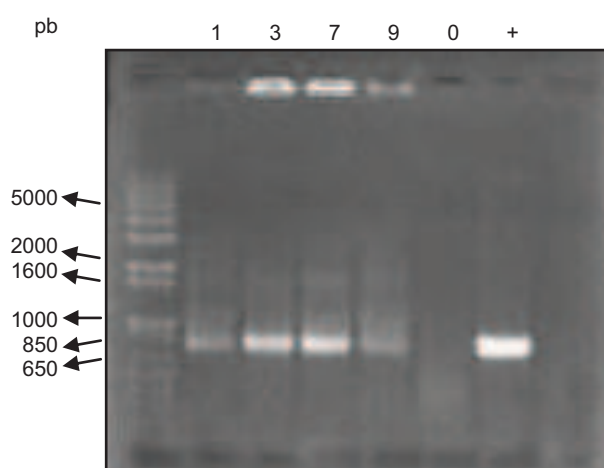


Figura 3.2 – Gel de electroforese resultante do PCR a colónias isoladas de *Agrobacterium tumefaciens* transformado com o plasmídeo pTRA-BT-AH realizado antes da transformação das culturas *wild-type*. As pistas numeradas 1, 3, 7 e 9 respeitam a quatro colónias isoladas; as pistas 0 e + correspondem aos controlos negativo (sem bactéria e sem plasmídeo) e positivo (sem bactéria, apenas plasmídeo), respectivamente.

Através da observação do gel resultante (Figura 3.2), e por análise análoga ao gel anterior, verificou-se que as quatro colónias testadas se revelaram positivas para a sequência alvo, contendo então o gene de interesse. Assim, e como se observou um sinal mais forte para as colónias 3 e 7 estas foram as utilizadas para prosseguir para a transformação das culturas *wild-type*.

O protocolo de transformação mediada por *Agrobacterium* seguido neste projecto foi adoptado de relatórios existentes para a transformação de culturas de células de tabaco (An, 1985) e de *Arabidopsis* (Forreiter *et al.*, 1997), que contemplam um período óptimo de co-cultura de 48 horas. Também foi tido em conta um relatório otimizado no laboratório para a transformação de culturas celulares BY-2, que visa uma densidade óptica de 1,5 da cultura de *Agrobacterium* a utilizar.

Para a transformação por co-cultura (secção 2.2.5 dos Materiais e Métodos), foram utilizadas culturas celulares em suspensão A17 de *Medicago truncatula* com pouco mais de um mês. Estabelecidas as culturas em suspensão, procederam-se a várias trocas de meio de cultura fresco suplementado com antibiótico de selecção de células transformadas (canamicina) e antibiótico para eliminar *Agrobacterium* (timentina).

Em simultâneo com objectivos deste projecto, e seguindo todo o protocolo já mencionado para as culturas de *Medicago truncatula*, procedeu-se igualmente ao protocolo de transformação por *Agrobacterium* de culturas celulares de *Arabidopsis thaliana* *wild-type* com o objectivo de estabelecer culturas em suspensão expressando a mesma proteína.

3.1.2. Indução de *callus* partindo de planta transgénica estável

Paralelamente, e como plano alternativo viável à transformação directa de culturas de células de *Medicago truncatula* *wild-type*, foi induzida a formação de *callus* a partir de folhas e porções de caule de plantas *Medicago* estáveis expressando β -trace recombinante na forma secretada. Sensivelmente um mês após a indução de *callus*, a quantidade formada foi suficiente para ser transferido para meio de cultura líquido e serem estabelecidas culturas celulares em suspensão (como descrito na secção 2.3 e esquematizado na Figura 3.3).

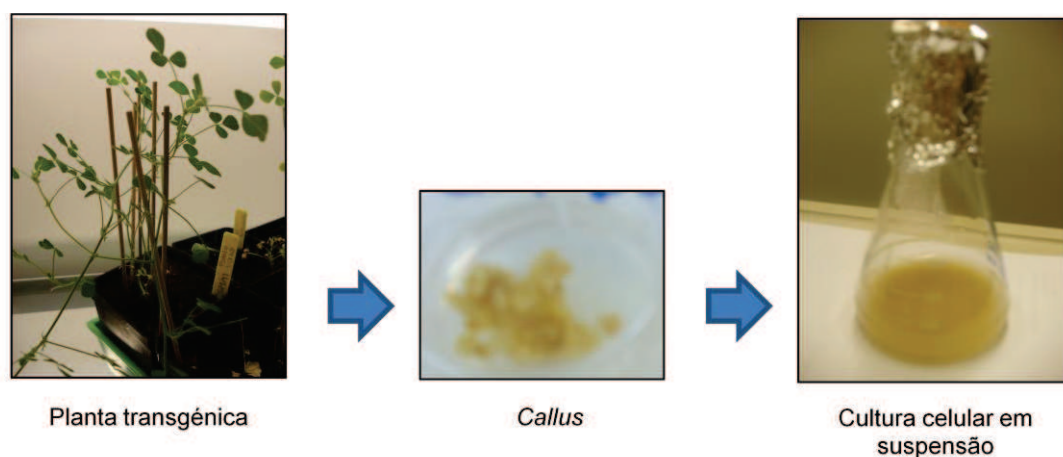


Figura 3.3 – Esquema do estabelecimento de culturas de células em suspensão a partir de planta transgénica.

3.2. Verificação da presença da β -trace recombinante

Depois de estabelecidas as várias culturas em suspensão, o passo seguinte consistiu em verificar se a β -trace estava de facto a ser produzida e secretada para o meio de cultura.

3.2.1. Culturas em suspensão obtidas por transformação directa

Cerca de dois meses depois da transformação, procedeu-se à verificação da presença da proteína recombinante, no meio de cultura e também nos agregados celulares, mesmo sendo a proteína secretada. Visando este objectivo, realizaram-se *Dot-Blot* de amostras proteicas de ambas as proveniências (como descrito na secção 2.4.1. dos Materiais e Métodos). As amostras de meio de cultura foram concentradas 20x por precipitação com etanol; para ambos os testes foram igualmente testadas amostras proteicas de culturas *wild-type* (A17) com o intuito de funcionarem como controlo

negativo. No entanto, nenhum dos *Dot-Blot* revelou sinal positivo para a presença da β -trace (resultados não apresentados).

Também das culturas transformadas de *Arabidopsis thaliana* foram retiradas amostras proteicas e submetidas a *Dot-Blot*, não se obtendo resultado positivo no que respeita à presença da proteína em estudo.

O facto de este ser o primeiro relatório que visa a transformação directa, mediada por *Agrobacterium*, de culturas celulares de *Medicago truncatula*, permite justificar o mau resultado obtido para a mesma. Uma vez que foram adoptados dados que constam noutros relatórios, estas podem não ser as condições ideais para a transformação de culturas em suspensão desta espécie vegetal. Assim, há que ter em conta para além da densidade óptica das culturas de *Agrobacterium* a utilizar para a transformação e do tempo óptimo de co-cultura, a idade com que a cultura celular é transformada, pelo que estes parâmetros merecem uma melhor avaliação de forma a serem optimizados.

3.2.2. Culturas em suspensão obtidas a partir de *callus* transformado

Para as culturas em suspensão obtidas a partir de *callus* (com origem em folha ou caule de planta transformada), os testes de confirmação da produção da β -trace foram todos realizados ao meio de cultura.

Realizou-se então um *Western-Blot* (como descrito na secção 2.4.2) com uma amostra de meio de cultura recolhida com cerca de um mês e concentrada 40x por precipitação com etanol, tendo-se aplicado 25 μ L de amostra nos poços. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.4.

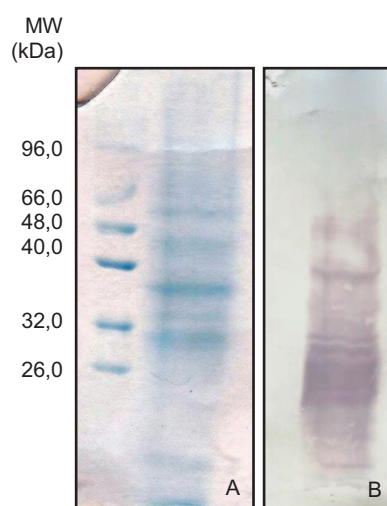


Figura 3.4 – SDS-PAGE (A) e *Western-Blot* (B) de meio de cultura de *Medicago truncatula*. A amostra proteica testada foi recolhida com cerca de um mês e concentrada 40x.

Por análise do resultado obtido por *Western-Blot* (Figura 3.4 B), confirmou-se a presença de β -trace no meio de cultura. O sinal obtido, apesar de muito arrastado por toda a pista resultando de

várias ligações inespecíficas, é mais acentuado na zona 24-28kDa, aproximadamente, o que corresponde à zona esperada para a proteína (entre 26 e 28kDa). Esta grande mancha observada na membrana deveu-se a uma concentração excessiva da amostra proteica e, possivelmente, a um tempo de reacção demasiado prolongado.

Uma vez que a transformação directa de culturas celulares *wild-type* não teve resultados positivos, o estabelecimento de culturas de *Medicago* transgénicas a partir de *callus* já transformado mostrou-se viável para prosseguir este projecto. Assim, e estando estas culturas a secretar β -trace em elevada quantidade e de forma eficiente para o meio de cultura, foram as utilizadas nas diversas estratégias de purificação abordadas no capítulo seguinte.

3.3. Abordagens seguidas para purificação da β -trace do meio de cultura

Posteriormente à confirmação da presença de β -trace no meio de cultura celular obtida a partir de *callus* transgénico, procedeu-se à purificação da mesma, tendo-se para tal recorrido a diversas estratégias distintas.

3.3.1. Cromatografia de Afinidade

Como primeira abordagem, realizou-se uma cromatografia de afinidade com ião metálico imobilizado (IMAC). Esta técnica cromatográfica permite tirar partido da presença de uma cauda de seis histidinas na proteína recombinante (His-tag presente no vector utilizado para a transformação), que se ligam reversivelmente a iões metálicos imobilizados numa matriz.

Após o passo prévio de filtração da cultura celular para eliminação de agregados, procedeu-se a uma cromatografia de afinidade em *batch* com o meio de cultura recolhido (como descrito na secção 2.5.1 dos Materiais e Métodos). Um volume de cerca de 50mL de meio de cultura foi colocado em incubação com 200 μ L de resina Ni-NTA, durante 2 horas com agitação. Teoricamente, a cauda de histidinas presente na β -trace recombinante tem afinidade para os iões níquel imobilizados na resina, devendo ligar-se a esta. Depois de recolhida toda a fracção não ligada (*flow-through*, FT) numa coluna cromatográfica, a fracção que se ligou à resina foi eluída com duas soluções de Imidazole, que é um ligando competitivo. Assim, nesta cromatografia procedeu-se a duas eluições (E) com diferentes concentrações de Imidazole, respectivamente 250 e 400mM em tampão PBS pH4,5 (1mL cada), bem como a uma eluição final com EDTA 0,5M (1mL). O EDTA, sendo um agente quelante, remove os iões níquel da resina, arrastando possíveis proteínas que não tenham eluído nos passos anteriores (E_{EDTA}).

As fracções obtidas foram concentradas 8,3x por precipitação com etanol, tal como uma alíquota de meio de cultura não purificado (M), que foi concentrada 5x. Todas estas amostras foram então submetidas a *Western-Blot*, sendo aplicados nos poços dos géis 25 μ L de cada fracção cromatográfica e, aproximadamente, 12 μ L de amostra de meio não purificado (tentando evitar que o

sinal na membrana seja demasiado forte). Também foi testado pela primeira vez uma amostra de meio de cultura de *Medicago truncatula* *wild-type* M910a (WT), sendo carregados 25µL desta.

Os resultados são apresentados na Figura 3.5.

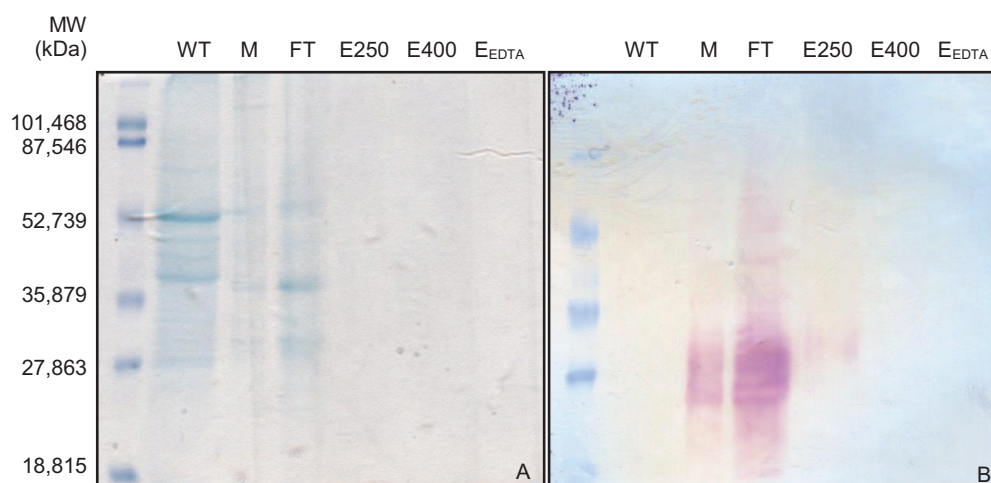


Figura 3.5 – SDS-PAGE (A) e Western-Blot (B) de fracções obtidas por cromatografia de afinidade de meio de cultura de *Medicago truncatula*, bem como referentes a meio de cultura *wild-type* M910a. WT: meio de cultura *wild-type*; M: meio de cultura não purificado; FT: fracção não ligada à resina; E250 e E400: fracções eluídas com solução de Imidazole 250 e 400mM, respectivamente, pH 4,5; E_{EDTA}: fracção eluída com EDTA 0,5M.

Os resultados obtidos por *Western-Blot* (Figura 3.5 B) permitiram concluir que a proteína foi eluída maioritariamente na fracção não ligada à resina (FT), apresentando um sinal muito forte e arrastado nesta pista, o que vem contrariar o teoricamente esperado. Contudo, também é possível observar uma banda muito ténue na pista referente à eluição com Imidazole 250mM (E250), inferindo-se que parte da β -trace se ligou efectivamente à resina. É então possível que a β -trace não se esteja a ligar totalmente à resina, ou pelo menos de forma completamente efectiva.

Por outro lado, através da observação do gel de SDS-PAGE corado com coomassie (Figura 3.5 A), confirma-se a presença de proteína nas três primeiras pistas (WT, M e FT), ainda que muito ténue; no entanto, na pista referente ao eluado com Imidazole 250mM e apesar desta ter tido sinal positivo para a β -trace na membrana, não é visível a presença de proteína nesta fracção, indicando que a existir é em quantidades bastante pequenas.

Verificou-se igualmente que o sinal obtido na membrana foi ligeiramente mais elevado do que o esperado para a β -trace (28kDa, correspondente ao quinto marcador), o que é mais visível na pista E250.

De salientar ainda que, como previsto, o meio de cultura *wild-type* não revelou presença de proteína recombinante.

Assim, e como a interacção com a resina não foi totalmente eficaz, é necessário otimizar as condições de ligação à mesma, nomeadamente o tempo de incubação, o tipo de tampão de equilíbrio utilizado e o pH da amostra. O facto de não se ter alterado o valor de pH do meio de cultura (pH 5, aproximadamente) pode ter influenciado de forma significativa os resultados obtidos nesta

cromatografia; tal foi mais tarde confirmado, quando, a um valor de pH superior, se verificou que a proteína se ligou à resina Ni-NTA com maior eficiência (secção 3.3.3.1).

3.3.2. Cromatografia de Troca Iónica a pH 7,6

Não tendo sido obtidos resultados satisfatórios com a cromatografia de afinidade, partiu-se para uma estratégia de cromatografias de troca iónica. Esta técnica de purificação baseia-se nas interações electrostáticas estabelecidas entre proteínas carregadas à superfície (que varia de acordo com o pH do meio) e permutadores iónicos ligados a uma matriz; ou seja, permite a separação das proteínas com base na sua carga global.

Ao contrário da cromatografia de afinidade em que se sabia à partida que a proteína deveria ligar à resina, neste caso, uma vez que se desconhece exactamente o ponto isoeléctrico (*PI*) da β -trace produzida em planta, ignora-se as condições ideais a seguir para a purificação da mesma.

Como tal, foram adoptadas várias abordagens. Utilizaram-se duas resinas distintas: a resina de troca catiónica SP-Sepharose e a resina de troca aniónica DEAE-Sepharose, ambas sob diferentes condições de pH. No caso do valor de pH do tampão utilizado ser menor que o *PI* da proteína, esta adquire carga global positiva, no caso em que o valor de pH do tampão é superior ao valor do *PI*, então a proteína adquire carga global negativa. Consequentemente, a um mesmo valor de pH, se a proteína se liga a uma das resinas, não se ligará à outra de carga contrária, pelo que o valor do *PI* da proteína pode ser inferido, aproximadamente, conforme os valores de pH testados. No entanto, a escolha do valor de pH a utilizar deve ser ponderada, tendo em conta que valores extremos podem resultar na desnaturação irreversível da proteína e que valores muito próximos do *PI* podem dar origem a resultados inconclusivos.

Deste modo, começou-se por testar ambas as resinas a um pH próximo de neutro, seguindo o protocolo descrito na secção 2.5.2 dos Materiais e Métodos. Dois volumes de 25mL de meio de cultura foram incubados, separadamente, com 1mL de cada resina, durante 3 horas. Numa coluna cromatográfica, após recolhidas as fracções não ligadas a ambas as resinas, eluíram-se as fracções ligadas com uma solução salina de NaCl 500mM em tampão PBS pH 7,6 (5mL). Nestas condições de pH, o tampão de equilíbrio utilizado também para as lavagens das resinas foi o tampão PBS pH 7,6. As fracções obtidas (FT e E500) para ambas as trocas iónicas foram concentradas 13,3x por precipitação com etanol e submetidas a *Western-Blot*, sendo aplicados nos poços 25 μ L de cada fracção.

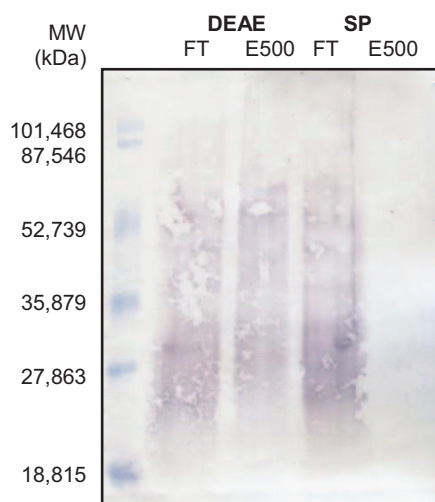


Figura 3.6 – *Western-Blot* de fracções obtidas por cromatografia de troca aniónica e catiónica de meio de cultura de *Medicago truncatula* a pH 7,6. FT (DEAE): fracção não ligada à resina DEAE-Sepharose; E500 (DEAE): fracção eluída da resina DEAE-Sepharose com solução de NaCl 500mM pH 7,6; FT (SP): fracção não ligada à resina SP-Sepharose; E500 (SP): fracção eluída da resina SP-Sepharose com solução de NaCl 500mM pH 7,6.

Observando os resultados obtidos por *Western-Blot* (Figura 3.6), verificou-se a presença de fortes manchas ao longo das primeiras três pistas. Este sinal arrastado indica o estabelecimento de várias ligações inespecíficas, possivelmente derivado de um tempo de reacção excessivo, bem como uma possível concentração exagerada das amostras; contudo, sendo mais forte na zona esperada para a β -trace, permite concluir que esta está presente nas várias fracções. Assim, enquanto que a presença da β -trace na fracção não ligada à resina DEAE-Sepharose é expectável, uma vez que as condições de ligação não estão ainda optimizadas, o facto de esta também estar presente na fracção ligada à mesma resina é crucial, o que possibilita desde já inferir que se estará a trabalhar a um valor de pH bastante próximo ao valor de *PI* da proteína (sensivelmente próximo de 7,6).

Por outro lado, o gel de *SDS-PAGE* obtido para estas fracções (não apresentado) mostrou a presença de bastante proteína em todas elas, pelo que o processo de purificação da β -trace recombinante deverá prosseguir com outro passo. Deste modo, e apesar de se ter presumido que as condições de pH utilizadas não seriam as ideais, seguiu-se com a realização de uma cromatografia de afinidade à fracção não ligada à resina SP-Sepharose e ao eluado da resina DEAE-Sepharose, mantendo as mesmas condições de pH.

3.3.2.1. Cromatografia de Afinidade a fracções obtidas por Troca Iónica a pH 7,6

A fracção não ligada resultante da troca catiónica com a resina SP-Sepharose foi então incubada com 100 μ L de resina Ni-NTA, *overnight*, tendo-se recolhido 20mL de fracção não ligada e 1mL de eluado com solução de Imidazole 400mM em tampão PBS pH 4,5. Ambas as fracções foram concentradas 5x por precipitação com etanol, bem como uma amostra da fracção inicial submetida a esta cromatografia; aplicados 25 μ L em cada poço dos géis, realizou-se *Western-Blot* (Figura 3.7).

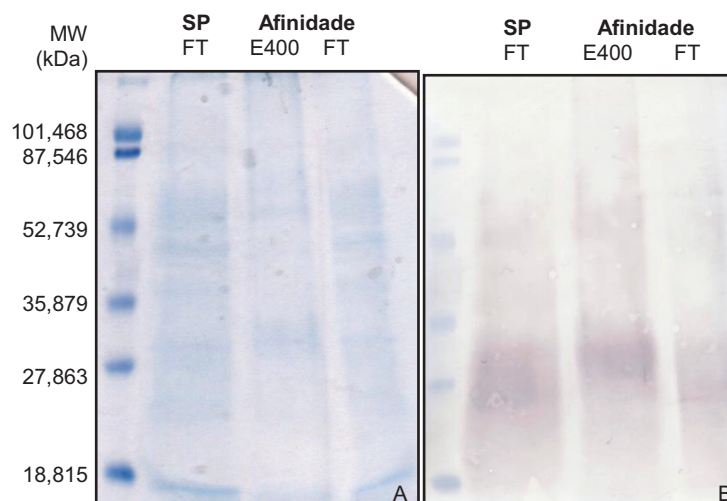


Figura 3.7 – SDS-PAGE (A) e Western-Blot (B) de fracções obtidas por cromatografia de afinidade da fracção não ligada à resina catiónica SP-Sepharose a pH 7,6. FT (SP): fracção não ligada à resina SP-Sepharose; FT (Afinidade): fracção não ligada à resina Ni-NTA; E400: fracção eluída com solução de Imidazole 400mM pH 4,5.

Pelos resultados obtidos, verificou-se a presença da β -trace nas duas fracções resultantes da cromatografia de afinidade, mas maioritariamente na fracção ligada à resina Ni-NTA, corroborando o que era expectável. Observou-se igualmente que a banda obtida na pista E400 é um pouco mais alta do que a presente na fracção anterior à afinidade (FT-SP) e que o ténue sinal na pista FT é, por oposição, ligeiramente mais baixo.

No que respeita à cromatografia de afinidade efectuada à fracção ligada à resina DEAE-Sepharose da cromatografia de troca aniónica realizada anteriormente, esta foi também incubada em 100 μ L de resina Ni-NTA, *overnight*. Depois de recolhidos 20mL de fracção não ligada e 1mL de eluado com solução de Imidazole 400mM pH 4,5, estas foram concentradas 5x por precipitação com etanol e submetidas a *Western-Blot* (resultados não apresentados).

Os resultados obtidos neste *Western-Blot* não se mostraram satisfatórios, sendo praticamente impossível observar sinal para a β -trace em qualquer pista, inclusive na referente à fracção ligada à resina DEAE anterior à cromatografia de afinidade.

Todos estes resultados pouco aceitáveis e inconclusivos, em que a proteína recombinante aparenta estar presente tanto nas fracções não ligadas como nas fracções ligadas às resinas aniónica e catiónica, reforçaram a ideia de que se estaria a trabalhar a um valor de pH bastante próximo do *PI* da β -trace produzida em planta.

Em estudos anteriores, através de electroforese bidimensional, foram detectadas múltiplas isoformas da L-PGDS em amostras de fluido cerebrospinal humano, cujos valores de *PI* foram estimados num intervalo entre 5,0 e 8,0 (Lescuyer *et al.*, 2005). Também em Schlatterer *et al.* (2006) é reportado um intervalo de valores de *PI* semelhante (mais concretamente entre 4,7 e 7,2) para as diversas isoformas da mesma proteína com origem humana. Contudo, sendo este o primeiro relatório referente à produção recombinante desta proteína em sistemas vegetais, apenas é possível inferir

que a β -trace de origem vegetal também poderá apresentar diferentes isoformas com diferentes valores de *PI*, possivelmente próximos dos intervalos estimados para a proteína humana.

De forma a contornar este problema, a estratégia adoptada de seguida passou por se alterar significativamente o pH do meio de cultura, começando por um valor ácido e uma cromatografia de troca aniónica.

3.3.3. Cromatografia de Troca Aniónica a pH 4,5

Um volume de meio de cultura foi diluído com tampão acetato de sódio 0,05M pH 4,5 de forma a ajustar o pH para o valor pretendido (aproximadamente 4,5). Depois de 3 horas de incubação com 1mL de resina aniónica DEAE-Sepharose previamente equilibrada no mesmo tampão, a fracção não ligada de meio de cultura foi recolhida numa coluna cromatográfica. Seguiram-se então duas eluições diferenciais recorrendo a duas soluções salinas de diferentes concentrações: NaCl 500mM e 1000mM pH 4,5. Cada uma das fracções resultantes foi concentrada 10x por precipitação com etanol, bem como uma alíquota de meio de cultura não purificado, sendo submetidas a *Western-Blot* (30 μ L por poço dos géis).

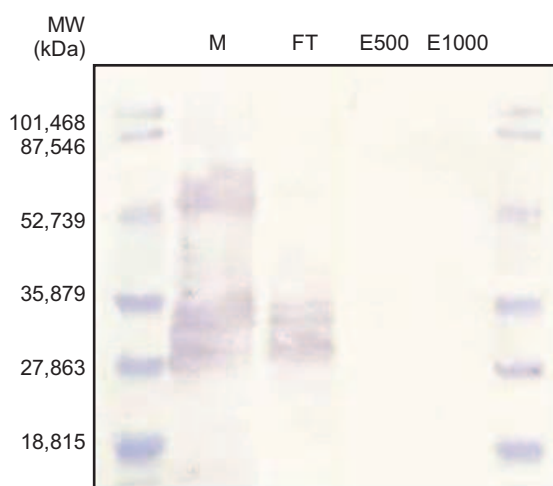


Figura 3.8 – *Western-Blot* de fracções obtidas por cromatografia de troca aniónica de meio de cultura de *Medicago truncatula* a pH 4,5. M: meio de cultura não purificado; FT: fracção não ligada à resina DEAE-Sepharose; E500: fracção eluída da resina com solução de NaCl 500mM pH 4,5; E1000: fracção eluída da resina com solução de NaCl 1000mM pH 4,5.

A partir do resultado obtido por *Western-Blot* (Figura 3.8), verificou-se claramente que, a um valor de pH 4,5, a β -trace se encontra exclusivamente na fracção não ligada à resina aniónica DEAE-Sepharose (FT), sendo que as pistas correspondentes às eluições com solução salina (E500 e E1000) não revelaram qualquer sinal da proteína recombinante. Este resultado permite afirmar que se a este valor de pH a proteína não se ligou à resina aniónica, esta terá adquirido carga global positiva, ou seja, confirma-se que a mesma tem um valor de *PI* superior ao pH utilizado.

De salientar igualmente o sinal obtido na pista que respeita ao meio de cultura não purificado (M), nomeadamente a presença de uma banda de forte intensidade superior a 52kDa. O

aparecimento desta banda foi recorrente em outros resultados obtidos e apresentados mais à frente, sendo discutido na secção seguinte.

Verificou-se também que, como previsto, a amostra de meio de cultura não purificado apresentou um sinal muito forte para a β -trace e ainda que, quer no meio de cultura quer na fracção FT, o sinal que se obteve foi ligeiramente superior a 28kDa, o esperado para a proteína recombinante.

Apesar de não ser apresentado o gel de *SDS-PAGE* resultante, este mostrou um conteúdo proteico ainda elevado na fracção não ligada à resina, pelo que se optou por prosseguir com a estratégia de purificação, com a uma cromatografia de afinidade a esta fracção não ligada da cromatografia de troca aniónica.

3.3.3.1. Cromatografia de Afinidade

A estratégia de cromatografia de troca aniónica a pH 4,5 abordada no ponto anterior foi repetida para um novo volume de meio de cultura, cuja fracção não ligada resultante foi utilizada para realizar uma cromatografia de afinidade.

Começou-se por diluir esta fracção não ligada com tampão PBS pH 7,6, de forma a ajustar o pH para um valor próximo de 7. Posteriormente, ficou a incubar *overnight* com 100 μ L de resina Ni-NTA já equilibrada no mesmo tampão; depois de eluída a fracção não ligada, aplicou-se 6mL de solução de Imidazole 400mM pH 4,5 para eluição da fracção ligada à resina. As amostras aplicadas no gel que foi corado com nitrato de prata foram concentradas 20x por precipitação com etanol e carregados 30 μ L em cada poço; no gel que seguiu para *Western-Blot*, a concentração foi de 10x, sendo aplicados 25 μ L por poço (Figura 3.9).

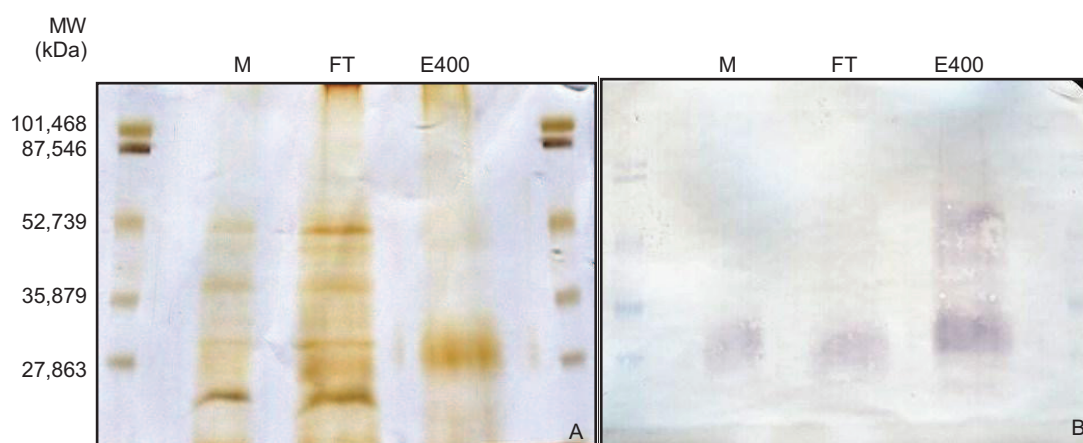


Figura 3.9 – *SDS-PAGE* (A) e *Western-Blot* (B) de fracções obtidas por cromatografia de afinidade da fracção não ligada à resina aniónica DEAE-Sepharose a pH 4,5. M: meio de cultura não purificado; FT: fracção não ligada à resina Ni-NTA; E400: fracção eluída com solução de Imidazole 400mM pH 4,5.

Os resultados obtidos por *Western-Blot* (Figura 3.9 B) permitiram concluir que a β -trace foi eluída maioritariamente na fracção ligada à resina (E400); esta encontra-se num grau de pureza

bastante satisfatório, o que pode ser comprovado pelo gel *SDS-PAGE* corado com nitrato de prata (Figura 3.9 A), cuja pista E400 apresenta apenas uma forte banda na zona dos 28kDa, correspondente à β -trace.

Ainda relativamente à fracção ligada à resina Ni-NTA, é também visível na membrana uma banda mais alta (e ligeiramente mais ténue), facto que já tinha sido observado para a amostra de meio de cultura não purificado respeitante à cromatografia anterior (Figura 3.8). Uma vez que esta banda apresenta um valor aparente de massa molecular de mais de 52kDa, bem como ao facto de reagir intensamente com o anticorpo específico para a β -trace, pode-se formular a hipótese de se tratar de um dímero desta proteína. No entanto, esta suposição carece de mais fundamento, visto que não existem para já estudos que reportem a formação de polímeros da β -trace (Urade *et al.*, 1985).

Igualmente na fracção não ligada à resina (FT) está presente a proteína recombinante, contudo numa quantidade significativamente menor. Tal como esperado, a amostra de meio de cultura (M) também possui β -trace, ainda que para esta não se tenha obtido um sinal muito forte.

Notar ainda que, uma vez mais, a banda relativa à purificação da β -trace (E400) é ligeiramente mais alta do que o sinal obtido nas restantes pistas. Esta observação, recorrente para as várias cromatografias, apontou para uma possível purificação de determinadas glicofomas da β -trace recombinante com diferentes massas moleculares. Mais tarde, como descrito na secção 3.5, procurou-se esclarecer esta questão.

Depois de obtido este resultado, e sendo que nestas condições a proteína recombinante se ligou eficazmente à resina Ni-NTA, pode-se corroborar o que já se tinha inferido aquando da primeira cromatografia de afinidade realizada ao meio de cultura (Figura 3.5), ou seja, que para esta não se obteve um resultado positivo precisamente devido ao facto de não se ter alterado o valor de pH do mesmo.

No que respeita à purificação da L-PGDS humana a partir de fluido cerebrospinal, estão já descritos vários procedimentos que contemplam uma estratégia de dois passos, nomeadamente cromatografias de troca iónica, exclusão molecular ou afinidade, resultando no isolamento da proteína nativa. Foi igualmente reportado que métodos envolvendo cromatografia de fase reversa originavam a desnaturação do enzima (revisto em Schlatterer *et al.*, 2006).

Para a purificação da β -trace recombinante secretada para o meio de culturas celulares de *Medicago truncatula*, adoptou-se como primeiro passo uma cromatografia de troca aniónica a pH 4,5, o que resultou numa separação eficaz desta proteína em apenas uma fracção altamente enriquecida na mesma. Como passo subsequente, e uma vez que esta fracção apresentou um elevado conteúdo proteico, foi apenas necessário prosseguir com uma cromatografia de afinidade, eliminando-se proteínas contaminantes e obtendo-se a proteína recombinante num grau de pureza muito satisfatório. Não houve, como tal, necessidade de se proceder a um passo de cromatografia de exclusão molecular.

3.3.4. Cromatografia de Troca Aniônica a pH 9,6

Uma vez verificado que a um valor de pH baixo a β -trace recombinante não se liga à resina aniônica DEAE-Sepharose, procedeu-se a uma nova troca aniônica desta vez elevando significativamente o valor de pH do meio de cultura para cerca de 9,6. Desta forma, ultrapassa-se o suposto valor do ponto isoelétrico da proteína, pelo que esta já deverá ligar-se à resina.

Para tal, o meio de cultura começou por ser diluído em tampão Glicina-NaOH 50mM pH 9,6, ajustando-se o pH do mesmo para o valor pretendido. Após 3 horas de incubação em 1mL de resina DEAE-Sepharose previamente equilibrada no mesmo tampão, eluiu-se a fracção não ligada à resina. A fracção ligada à mesma foi depois eluída com uma solução de NaCl 500mM pH 9,6. Alíquotas de 6 mL de cada fracção foram concentradas por ultrafiltração (como descrito na secção 2.9.2) e posteriormente por precipitação com etanol a -20°C , sendo o total das alíquotas aplicado nos géis, seguindo-se a transferência para membrana e imunodeteção (*Western-Blot*) (Figura 3.10).

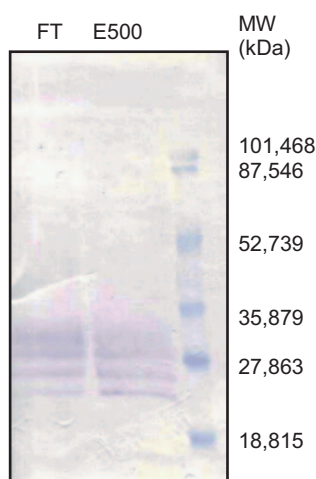


Figura 3.10 – *Western-Blot* de fracções obtidas por cromatografia de troca aniônica de meio de cultura de *Medicago truncatula* a pH 9,6. FT: fracção não ligada à resina DEAE-Sepharose; E500: fraccção eluída da resina com solução de NaCl 500mM pH 9,6.

Os resultados obtidos por *Western-Blot* (Figura 3.10) permitiram confirmar que, nestas condições de pH, a β -trace já se encontra de facto presente na fracção que se ligou à resina DEAE-Sepharose (E500), observando-se claramente sinal na membrana na zona 25-28kDa, aproximadamente. Ainda assim, a proteína recombinante está também presente na fracção não ligada à resina (FT).

Assim, como seria de esperar, trabalhando a um pH superior ao ponto isoelétrico da proteína, esta adquire carga global negativa, ligando-se a uma resina aniônica, como é a resina DEAE-Sepharose.

3.4. Estratégia adoptada e purificação de todo o meio de cultura

Após se ter conseguido purificar a β -trace num grau de pureza muito aceitável, a estratégia de purificação respeitante a uma troca aniônica a pH ácido seguida de uma cromatografia de afinidade a

pH 7,6 à fracção não ligada da primeira cromatografia foi adoptada para tentar purificar uma maior quantidade da proteína recombinante a partir de todo o meio de cultura existente.

Depois de repetida por várias vezes a estratégia seguida, inclusive com meio de cultura previamente concentrado por ultracentrifugação, verificou-se uma perda significativa de sinal da β -trace recombinante ao longo do tempo, indicador de um decréscimo, ou mesmo ausência, de expressão desta proteína.

Quatro amostras de meio de cultura, recolhidas nos meses de Maio (duas amostras) e Junho (duas amostras), foram concentradas por ultracentrifugação (24,7x, 51,4x, 55x e 71x, respectivamente) em dispositivos Amicon com limite de membrana de 10kDa, sendo posteriormente submetidas às cromatografias de troca aniónica (1mL de resina DEAE, incubação de 3 horas) e afinidade (100 μ L de resina Ni-NTA, incubação *overnight*). No final, obtiveram-se quatro eluados de 5mL com Imidazole 400mM pH 4,5, que foram concentrados 20x por precipitação com etanol. Foram igualmente concentradas 20x as quatro amostras respectivas de meio de cultura não purificado. Realizou-se então um *Western-Blot*, sendo carregados 30 μ L de amostra por poço; as amostras de meio, e correspondentes eluados, estão ordenadas da mais antiga (esquerda) para a mais recente (direita).

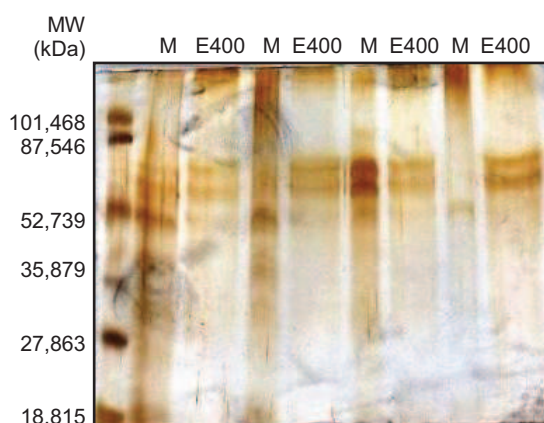


Figura 3.11 – SDS-PAGE de fracções obtidas por cromatografia de afinidade da fracção não ligada à resina aniónica DEAE-Sepharose a pH 4,5. M: meio de cultura não purificado; E400: fracção eluída com solução de Imidazole 400mM pH 4,5.

A membrana obtida para este *Western-Blot* não mostrou qualquer sinal para a β -trace em nenhuma das pistas, pelo que não foi apresentada. O gel de SDS-PAGE obtido e corado com nitrato de prata (Figura 3.11) mostrou igualdade dos padrões proteicos obtidos para as várias fracções purificadas (E400). Contudo, em nenhuma delas é visível a presença de uma banda que possa respeitar à β -trace recombinante (cerca de 28kDa); por outro lado, em todas se verifica a existência de duas bandas muito altas (aproximadamente 60-70kDa), que foram sendo mais visíveis em purificações de meios de cultura mais recente, à medida que se foi perdendo o sinal para a β -trace.

Também os padrões de proteínas obtidos para as várias amostras de meio de cultura (M) foram perdendo sinal ao longo do tempo, o que é claramente visível da primeira amostra de meio (esquerda) para a amostra mais recente (mais à direita no gel). Tal facto pode indiciar a instabilidade

destas culturas celulares em suspensão e uma não produção de biomassa, o que foi sendo gradualmente visível nas culturas mais recentes que apresentavam um aspecto bastante translúcido.

Estes resultados vêm em linha do que foi reportado por (Doran, 2006), que se refere à perda substancial e habitual de proteína recombinante secretada para o meio de cultura. A progressiva ausência de sinal para a β -trace pode indicar para fenómenos de silenciamento do gene que codifica para esta proteína ou mesmo para a degradação da mesma aquando da secreção para o meio de cultura.

3.5. Digestão com enzima PNGase A

Tendo a β -trace dois locais de N-glicosilação e sendo esta modificação pós-traducional essencial para a actividade, estabilidade e propriedades farmacocinéticas da proteína, como já revisto na Introdução, foi importante confirmar se a proteína recombinante se encontra, de facto, glicosilada. Por outro lado, e uma vez que se verificou recorrentemente ligeiras diferenças na massa molecular da proteína recombinante obtida entre fracções ligadas e não ligadas às resinas (Figuras 3.7 e 3.9), tornou-se essencial entender se as mesmas se deviam a uma purificação selectiva de diferentes isoformas da mesma com diferentes graus de glicosilação.

Com estes objectivos, foi realizada uma digestão com o enzima PNGase A. Este enzima permite a desglicosilação em oligossacáridos que contenham ligações $\alpha(1,3)$ fucose, típicas de proteínas vegetais (Garcia-Casado *et al.*, 1996); contudo, esta digestão depende grandemente da natureza da glicoproteína, possivelmente devido a problemas de acessibilidade enzimática (o enzima PNGase A tem 79,5kDa de massa molecular) (Garcia-Casado *et al.*, 1996; Tarentino *et al.*, 1985).

Para esta digestão enzimática foram utilizadas uma amostra de uma fracção não ligada à resina DEAE-Sepharose em condições ácidas (FT), bem como uma amostra de uma fracção ligada à resina resultante de uma cromatografia de afinidade (E400); para ambas já tinha sido confirmada a presença de β -trace. Estas amostras foram previamente concentradas 28,6x e 10,7x, respectivamente, por precipitação com etanol. Como descrito na secção 2.6 dos Materiais e Métodos, cada *pellet* obtido foi ressuscitado em 40 μ L de tampão citrato 100mM pH5, seguindo-se a adição de 2 μ L de PNGase A e a incubação durante 24 horas, a 37°C num banho seco. Posteriormente, depois de adicionado tampão de amostra, as amostras seguiram para *Western-Blot*. Como controlo negativo, foram utilizadas as mesmas amostras igualmente concentradas com etanol e ressuscitadas no mesmo tampão, mas sem a adição do enzima e posterior incubação.

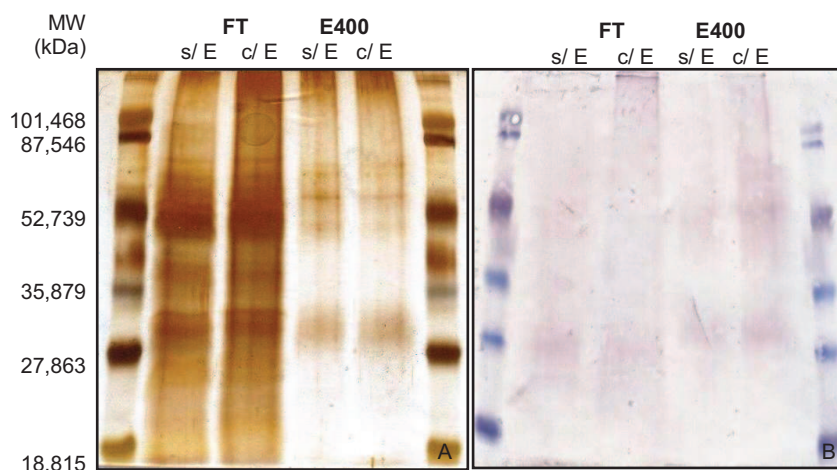


Figura 3.12 – SDS-PAGE (A) e Western-Blot (B) de fracções resultantes de cromatografias anteriores submetidas a digestão enzimática com PNGase A. FT: fracção não ligada à resina DEAE-Sepharose; E400: fracção ligada à resina Ni-NTA; s/ E: amostras não submetidas a digestão enzimática (controlo negativo); c/ E: amostras submetidas a digestão com enzima PNGase A.

Após observação dos resultados obtidos por *Western-Blot* (Figura 3.12), não se verificou qualquer diferença entre as amostras sujeitas a desglicosilação e os respectivos controlos negativos, nem no que respeita ao padrão de proteínas visível no gel, nem no sinal obtido na membrana para a β -trace. Este facto poderá dever-se aos problemas de acessibilidade do enzima descritos anteriormente, pelo que esta digestão só poderá oferecer resultados com pequenos péptidos. Como tal, não foi possível confirmar a glicosilação da β -trace recombinante, nem responder à questão da purificação selectiva de determinadas isoformas da mesma.

4. Conclusões e Perspectivas Futuras

Este projecto teve como objectivo o estudo de culturas celulares em suspensão de *Medicago truncatula* como sistema de expressão de proteínas recombinantes, mais concretamente do enzima humano prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS). Esta é a proteína mais abundante no fluido cerebrospinal, é altamente glicosilada e vulgarmente conhecida como β -trace.

A *Medicago truncatula*, espécie modelo para a família das leguminosas, apresenta um genoma que está completamente sequenciado e é de fácil transformação e manipulação, pelo que, como planta, tem sido utilizada no laboratório para *Molecular Farming*. Contudo, o trabalho desenvolvido neste projecto é inovador uma vez que não existe até ao momento nenhum estudo que reporte à transformação directa de culturas celulares em suspensão desta espécie vegetal. Também a produção da proteína β -trace numa plataforma vegetal de expressão respeita a um trabalho inédito.

Assim, no presente estudo, estabeleceram-se culturas celulares em suspensão de *Medicago truncatula* expressando β -trace na forma secretada para o apoplasto. O plano inicial visava a transformação directa por *Agrobacterium* de culturas de células *wild-type*, no entanto, não foram obtidos resultados positivos em testes de verificação da presença da proteína recombinante. Em paralelo, foram igualmente transformadas culturas celulares de *Arabidopsis thaliana wild-type*, para as quais também não se obteve um resultado positivo.

Foi então necessário seguir um plano alternativo viável, a partir de *callus* com origem em explantes de planta transgénica expressando de forma estável β -trace secretada. Estabelecidas estas culturas em suspensão, confirmou-se a presença da proteína recombinante no meio de cultura, indicador da sua produção e secreção eficiente.

No que respeitou à purificação da β -trace recombinante no meio de cultura, foram abordadas diversas estratégias. Principiou-se com uma cromatografia de afinidade que não se mostrou eficiente na ligação da proteína à resina Ni-NTA, tendo-se concluído que tal se deveu ao facto de não se ter alterado o valor de pH do meio de cultura. Seguiram-se então várias cromatografias de troca iónica, com uma resina de troca aniónica (DEAE-Sepharose) e outra de troca catiónica (SP-Sepharose) a um pH próximo de neutro; com estas abordagens constatou-se que o *PI* da β -trace produzida em planta será próximo do valor de pH a que se trabalhou, uma vez que a proteína estava presente tanto nas fracções ligadas como não ligadas às resinas. Este problema foi ultrapassado quando se passou para condições ácidas e se realizou uma cromatografia de troca aniónica; nesta situação, a proteína adquiriu carga global positiva e não se ligou à resina. Assim, tendo-se obtido apenas uma fracção bastante rica na proteína recombinante mas contendo ainda muitas outras proteínas, prosseguiu-se para uma cromatografia de afinidade, desta vez alterando o pH do meio de cultura para próximo de 7. Através desta estratégia de purificação de apenas dois passos, que respeita a uma troca aniónica a pH 4,5 seguida de uma cromatografia de afinidade a pH 7,6 à fracção não ligada à resina da primeira cromatografia, conseguiu-se purificar a β -trace recombinante num grau de pureza bastante satisfatório.

Uma vez seguida a abordagem referida para purificar a β -trace em todo o meio de cultura celular disponível, verificou-se a perda progressiva, e mesmo ausência, de produção desta proteína, o que pode estar relacionado com fenómenos de silenciamento genético ou de degradação proteica.

Ao longo deste extensivo ponto respeitante à purificação da proteína recombinante, constatou-se a existência de proteína com aparentemente o dobro da massa molecular esperada, podendo-se formular a hipótese de se tratar de um dímero. Contudo, esta possibilidade carece de mais fundamento, visto que não existem estudos que relatem a formação de polímeros da β -trace. Por outro lado, foram recorrentemente observadas ligeiras diferenças no valor de massa molecular da proteína recombinante, nomeadamente nas fracções obtidas nas diversas cromatografias, o que indicou que se poderia estar a purificar de forma selectiva determinadas isoformas da glicoproteína recombinante. Com o objectivo de esclarecer esta questão, procedeu-se a uma digestão enzimática com o enzima PNGase A a amostras de meio de cultura que continham β -trace, no entanto os resultados obtidos foram inconclusivos.

O projecto desenvolvido é ainda muito preliminar, derivado à sua duração e ao facto de se tratar de um trabalho inovador nos aspectos já referidos. No que respeita à transformação das culturas celulares de *Medicago truncatula*, trabalho futuro deverá contemplar uma optimização das condições ideais para a mesma, nomeadamente, a idade das culturas e o tempo óptimo de co-cultura com *Agrobacterium*. Uma vez transformadas, o crescimento e estabilidade das culturas deverá ser avaliado de forma a maximizar a produção de proteína, e neste caso a sua secreção para o meio.

Os passos de purificação, apesar de satisfatórios, podem ser optimizados, estudando alguns parâmetros como volume utilizado de resina, tempo de incubação, condições de pH e tampões de equilíbrio.

Após a purificação da β -trace, será imperativo confirmar a existência de diferentes isoformas da mesma com diferentes massas moleculares, determinando-se os distintos padrões de glicosilação através de Espectrometria de Massa. É igualmente crucial avaliar as diferenças na estrutura, propriedades bioquímicas e estabilidade do produto recombinante quando comparado com a proteína na sua forma nativa. Podem também ser feitos estudos para determinação exacta do ponto isoeléctrico da proteína, ou das suas glicoformas distintas, através de electroforese bidimensional. Numa outra fase, de forma a testar a função do enzima, é necessário determinar a sua actividade através de ensaios de conversão do substrato.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as culturas celulares em suspensão de *Medicago truncatula* estabelecidas são promissoras como plataforma viável para a produção de proteínas recombinantes com putativa aplicação terapêutica. Os resultados preliminares obtidos podem servir como base para trabalhos futuros neste âmbito, visando o estabelecimento de outros sistemas vegetais e sua utilização em *Molecular Farming*.

Bibliografia

- Abranches R, Marcel S, Arcalis E, Altmann F, Fevereiro P, Stoger E (2005) Plants as bioreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *Journal of Biotechnology*: 121-134
- An G (1985) High-efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiology* 79: 568-570
- Araújo S, Duque A, dos Santos D, Fevereiro M (2004) An efficient transformation method to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 78: 123-131
- Bakker H, Routier F, Ashikov A, Neumann D, Bosch D, Gerardy-Schahn R (2008) A CMP-sialic acid transporter cloned from *Arabidopsis thaliana*. *Carbohydrate Research* 343: 2148-2152
- Barta A, Sommergruber K, Thompson D, Hartmuth K, Matzke M, Matzke A (1986) The expression of a nopaline synthase/human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol* 6: 347–357
- Basaran P, Rodriguez-Cerezo E (2008) Plant Molecular Farming: Opportunities and Challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*: 153-172
- Boehm R (2007) Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Biology of Emerging Viruses: Sars, Avian and Human Influenza, Metapneumovirus, Nipah, West Nile, and Ross River Virus*: 121-134
- Castilho A, Strasser R, Stadlmann J, Grass J, Jez J, Gatteringer P, Kunert R, Quendler H, Pabst M, Leonard R, Altmann F, Steinkellner H (2010) In Planta Protein Sialylation through Overexpression of the Respective Mammalian Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 285: 15923-15930
- Commandeur U, Twyman RM, Fischer R. (2003) The biosafety of molecular farming in plants. *AgBiotechNet* 5: ABN110
- Cook D (1999) *Medicago truncatula* - a model in the making! Commentary. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 301-304
- Cox K, Sterling J, Regan J, Gasdaska J, Frantz K, Peele C, Black A, Passmore D, Moldovan-Loomis C, Srinivasan M, Cuisson S, Cardarelli P, Dickey L (2006) Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nature Biotechnology* 24: 1591-1597

D'Aoust MA, Lerouge P, Busse U, Bilodeau P, Trépanier S, Gomord V, Faye L, Vézina LP (2004) Efficient and Reliable Production of Pharmaceuticals in Alfalfa

Daniell H, Streatfield S, Wycoff K (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*: 219-226

De Zoeten GA, Penswick JR, Horisberger MA, Ahl P, Schultze M, Hohn T (1989) The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virology* 172: 213–222

Doran P (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 199-204

Doran P (2006) Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends in Biotechnology* 24: 426-432

Faye L, Boulafloous A, Benchabane M, Gomord W, Michaud D (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* 23: 1770-1778

Fischer R, Emans N (2000) Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*: 279-299

Fischer R, Emans N, Schuster F, Hellwig S, Drossard J (1999) Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 30: 109-112

Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman R (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 152-158

Forreiter C, Kirschner M, Nover L (1997) Stable transformation of an Arabidopsis cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo. *The Plant Cell* 9: 2171-2181

Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Chrispeels M, Armentia A, Salcedo G, Gomez L (1996) Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology* 6: 471-477

Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*: 1151-1155

Gomord V, Faye L (2004) Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 171-181

Gomord V, Fitchette A, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, Plasson C, Michaud D, Faye L (2010) Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal* 8: 564-587

González-Melendi P, Pires A, Abranches R (2009) Cell-line-dependent sorting of recombinant phytase in cell cultures of *Medicago truncatula*. *Functional Plant Biology* 36: 431-441

Hellwig S, Drossard J, Twyman R, Fischer R (2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology* 22: 1415-1422

Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342: 76–78

Hood E, Witcher D, Maddock S, Meyer T, Baszczyński C, Bailey M, *et al.* (1997) Commercial production of Avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Mol Breed* 3: 291–306

Horn M, Woodard S, Howard J (2004) Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports*: 711-720

James E & Lee JM (2001) The production of foreign proteins from genetically modified plant cells. *Biotechnology* 72

Jordan W, Tumani H, Cohrs S, Eggert S, Rodenbeck A, Brunner E, Ruther E, Hajak G (2004) Prostaglandin D synthase (beta-trace) in healthy human sleep. *Sleep* 27: 867-874

Kanekiyo T, Ban T, Aritake K, Huang Z, Qu W, Okazaki I, Mohri I, Murayama S, Ozono K, Taniike M, Goto Y, Urade Y (2007) Lipocalin-type prostaglandin D synthase/beta-trace is a major amyloid beta-chaperone in human cerebrospinal fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 6412-6417

Kapila J, De Rycke R, van Montagu M, Angenon G (1997) An agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci* 122: 101–8

Kumasaka T, Aritake K, Ago H, Irikura D, Tsurumura T, Yamamoto M, Miyano M, Urade Y, Hayaishi O (2009) Structural Basis of the Catalytic Mechanism Operating in Open-Closed Conformers of Lipocalin Type Prostaglandin D Synthase. *Journal of Biological Chemistry* 284: 22344-22352

Lescuyer P, Gandini A, Burkhard P, Hochstrasser D, Sanchez J (2005) Prostaglandin D2 synthase and its post-translational modifications in neurological disorders. *Electrophoresis* 26: 4563-4570

Liénard D, Sourrouille C, Gomord V, Faye L (2007) Pharming and transgenic plants. *Biotechnol Ann Rev* 13:115–47

Ma J, Drake P, Christou P (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*: 794-805

Mason HS, Lam DMK, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 11745–11749

Misaki R, Fujiyama K, Seki T (2006) Expression of human CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase and CMP-sialic acid transporter in tobacco suspension-cultured cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339: 1184-1189

Mulabagal V, Tsay HS (2004) Plant cell cultures – An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2,1: 29-48

Obembe O, Popoola J, Leelavathi S, Reddy S (2011) Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*: 210-222

Paccalet T, Bardor M, Rihouey C, Delmas F, Chevalier C, D'Aoust M, Faye L, Vezina L, Gomord V, Lerouge P (2007) Engineering of a sialic acid synthesis pathway in transgenic plants by expression of bacterial Neu5Ac-synthesizing enzymes. *Plant Biotechnology Journal* 5: 16-25

Pires AS, Cabral MG, Fevereiro P, Stoger E, Abranches R (2008) High levels of stable phytase accumulate in the culture medium of transgenic *Medicago truncatula* cell suspension cultures. *Biotechnology Journal* 3: 916-923

Saint-Jore-Dupas C, Faye L, Gomord V (2007) From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends in Biotechnology* 25: 317-323

Schillberg S, Emans N, Fischer R (2002) Antibody molecular farming in plant and plant cells. *Phytochemistry Reviews* 1: 45-54

Schillberg S, Fischer R, Emans N (2003) Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 433-445

- Schillberg S, Twyman R, Fischer R (2005) Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants - technology assessment. *Vaccine*: 1764-1769
- Scholthof H, Scholthof K, Jackson A (1996) Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu Rev Phytopathol* 34: 299–323
- Sijmons PC, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJM, Hoekema A (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technol* 8: 217–221
- Schlatterer J, Baeker R, Schlatterer B, Klose J, Kehler W, Schlatterer K (2006) Purification of prostaglandin D synthase by ceramic- and size exclusion chromatography. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 81: 80-89
- Sourrouille C, Marquet-Blouin E, D'Aoust M, Kiefer-Meyer M, Seveno M, Pagny-Salehabadi S, Bardor M, Durambur G, Lerouge P, Vezina L, Gomord V (2008) Down-regulated expression of plant-specific glycoepitopes in alfalfa. *Plant Biotechnology Journal* 6: 702-721
- Strasser R, Altmann F, Mach L, Glossl J, Steinkellner H (2004) Generation of Arabidopsis thaliana plants with complex N-glycans lacking beta 1,2-linked xylose and core alpha 1,3-linked fucose. *Febs Letters* 561: 132-136
- Strasser R, Stadlmann J, Schahs M, Stiegler G, Quendler H, Mach L, Glossl J, Weterings K, Pabst M, Steinkellner H (2008) Generation of glyco-engineered Nicotiana benthamiana for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure. *Plant Biotechnology Journal* 6: 392-402
- Streatfield S (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnology Journal* 5: 2-15
- Tanaka R, Miwa Y, Mou K, Tomikawa M, Eguchi N, Urade Y, Takahashi-Yanaga F, Morimoto S, Wake N, Sasaguri T (2009) Knockout of the l-pgds gene aggravates obesity and atherosclerosis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378: 851-856
- Tarentino A, Gomez C, Plummer T (1985) Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide – N-glycosidase F. *Biochemistry* 24: 4665-4671
- Thorpe T (2007) History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180
- Twyman R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*: 570-578

Urade Y, Eguchi N (2002) Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-9: 375-382

Urade Y, Fujimoto N, Hayaishio O (1985) Purification and characterization of rat-brain prostaglandin-d synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 260: 2410-2415

Urade Y, Hayaishi O (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1482: 259-271

Vasil I (2008) A short history of plant biotechnology. *Phytochem Rev* 7: 387-394

Vézina L, Faye L, Lerouge P, D'Aoust M, Marquet-Blouin E, Burel C, Lavoie P, Bardor M, Gomord V (2009) Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnology Journal*: 442-455

Wilhelm D, Hiramatsu R, Mizusaki H, Widjaja L, Combes A, Kanai Y, Koopman P (2007) SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. *Journal of Biological Chemistry* 282: 10553-10560

Xu J, Ge X, Dolan M (2011) Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances* 29: 278-299

Anexos

Preparação de meios de cultura:

Meio Murashige & Skoog (MS) com hormonas

Solução-stock de 50mL de meio Murashige & Skoog (20x concentrado)

30g Sacarose

1mg 2,4D 1mg/mL

1mg Cinetina 1mg/mL

10mg DTT 10mg/mL

(para meio sólido, adicionar 7g de agar)

Preparado em água destilada para um volume final de 1L de meio de cultura; pH 5,8 ajustado com NaOH 0,5M. Autoclavar.

Meio Yeast Extract Broth (YEB)

5g Extracto de carne

1g Extracto de levedura

5g Triptona

5g Sacarose

(para meio sólido, adicionar 15g de agar)

Preparado em água destilada para um volume final de 1L de meio de cultura; pH 7,4. Autoclavar.

Nota: Ao meio YEB é sempre necessário adicionar magnésio (MgSO_4) – Tabela 1. Quando suplementado com magnésio, o meio toma a designação de YEB⁺.

Tabela 1 – Concentrações stock e final de MgSO_4 a utilizar em meio YEB.

	C_{stock}	C_{final}
MgSO₄	0,5M	2mM

Antibióticos

As soluções-stock dos antibióticos foram preparadas para o valor de concentração indicado na tabela com o respectivo dissolvente. São filtradas (filtros 0,22µm) com o auxílio de uma seringa, alíquotadas e guardadas a -20°C. As concentrações finais a que são utilizadas encontram-se também na tabela abaixo.

Tabela 2 – Concentrações stock e final dos antibióticos utilizados para suplementar meio de cultura.

	C_{stock}	C_{final}
Rifampicina (Rif)	100mg/mL (em DMSO)	50mg/L
Canamicina (Kan)	100mg/mL (em água)	25mg/L
Carbenicilina (Carb)	250mg/mL (em água)	50mg/L
Timentina (Tim)	250mg/mL (em água)	500mg/L

Preparação de soluções:**Glycerol Stock Media (GSM) estéril**

50% Glicerol

100mM MgSO₄

25mM Tris

pH 7,4

Tampão TAE (50x concentrado)

2M Tris-Base

10% (v/v) EDTA 0,5M pH 8

5,71% (v/v) Ácido acético glacial

Preparado em água destilada. O tampão é guardado a temperatura ambiente.

Orange G (10x concentrado)

100mg Orange G

15mL Glicerol

Perfazer com água destilada para 50mL e misturar bem. A solução é guardada a 4°C.

Marcador 1Kb⁺

10% (v/v) Kb stock

10% (v/v) Orange G (10x)

Preparado em água destilada estéril. A solução é guardada a 4°C.

Tampão de extracção de proteínas

10mM Ácido ascórbico

500mM Cloreto de sódio

5mM β-mercaptoetanol

Preparado em água destilada; pH 8,0 ajustado com NaOH 1M (algumas gotas). A solução é guardada a 4°C.

Tampão de amostra (4x concentrado)

0,125M Tris-base

0,4% (w/v) SDS

20% (v/v) Azul de bromofenol

20% (v/v) β -mercaptoetanol

Preparado em água. A solução é guardada a -20°C.

Tampão de amostra (1x concentrado)

Preparado por diluição directa do tampão de amostra (4x) com água destilada. O tampão é guardado a -20°C.

Tampão para o gel de resolução

3M Tris-HCl pH 8,8

A solução é guardada a 4°C.

Tampão para o gel de concentração

0,5M Tris-HCl pH 6,8

A solução é guardada a 4°C.

SDS a 10%

10g de SDS em 100mL de água destilada.

A solução é guardada a temperatura ambiente.

Persulfato de amónio a 1,5%

0,15g de Persulfato de amónio em 10mL de água destilada.

A solução é guardada a -20°C.

TEMED

Usado na forma fornecida e guardado a 4°C.

Tampão de corrida (10x concentrado)

25mM Tris-Base

192mM Glicina

0,1% SDS

Preparado em água destilada; pH 8,3 (não é necessário ajustar). O tampão é guardado a temperatura ambiente.

Solução corante (azul de Coomassie G250)

45% (v/v) Metanol 100%

10% (v/v) Ácido acético

0,1% (w/v) Azul de Coomassie

A solução é guardada a temperatura ambiente.

Solução descorante

45% Metanol

10% Ácido acético

Preparada em água destilada. A solução é guardada a temperatura ambiente.

Coloração com Nitrato de Prata

Solução 1 (100mL) – 50% etanol, 12% ácido acético, 0,5 mL/L formaldeído 37%

Solução 2 (400mL) – 50% etanol

Solução 3 (150mL) – 0,2g/L tiosulfato de sódio pentahidratado

Solução 5 (50mL) – 2g/L nitrato de prata, 0,75mL/L formaldeído 37% (manter no escuro)

Solução 7 (100mL) – 60g/L carbonato de sódio, 4mg/L tiosulfato de sódio pentahidratado, 0,5mL/L formaldeído 37%

Solução 9 (100mL) – 50% etanol, 12% ácido acético

As soluções 5 e 7 foram reutilizadas no período de um mês, aproximadamente, sendo guardadas a 4°C. As restantes são preparadas na altura da coloração do gel.

Tampão de transferência de proteínas

20% Metanol

10% Tampão de corrida (10x concentrado)

Preparado em água destilada.

Tampão PBS pH 7,6 (10x concentrado)

1,37M NaCl

26,9mM KCl

16,8mM Na₂HPO₄, 12H₂O

15mM KH₂PO₄

Preparado em água; pH 7,4 ajustado com HCl 1M

Tampão PBS pH 7,6 (1x concentrado)

Preparado por diluição directa do tampão PBS pH 7,6 (10x)

Tampão PBS-T

Tampão PBS pH 7,6 (1x concentrado)

0,1% (v/v) Tween 20

Tampão NBT/BCIP

0,1M Tris-HCl pH 9

0,01M NaCl

0,05M MgCl₂

Preparado em água destilada.

Tampões para cromatografias de afinidade e troca iónica:

Tampão PBS pH 4,5

Preparado por diluição directa do tampão PBS pH 7,6 (10x); pH ajustado com HCl.

Tampões de eluição em cromatografia de afinidade

Imidazole 250mM em tampão PBS pH 4,5

Imidazole 400mM em tampão PBS pH 4,5

EDTA 0,5M pH 8,0

Tampão Acetato de Sódio 50mM pH 4,5 (5x concentrado)

Solução 50mM de acetato de sódio em água destilada; pH 4,5 ajustado com ácido acético.

Tampão Glicina-NaOH 50mM pH 9,6

0,2M Glicina

0,2M NaOH

Preparado em água destilada.

Tampões de eluição em cromatografias de troca iónica

NaCl 500mM em tampão PBS pH 7,6

NaCl 1000mM em tampão PBS pH 7,6

NaCl 500mM em tampão acetato de sódio 50mM pH 4,5

NaCl 500mM em tampão Glicina-NaOH 50mM pH 9,6

Tampão para digestão com PNGase A:

Tampão Citrato 100mM pH 5 com EDTA 10mM

0,77g Ácido cítrico

1,86g Citrato de sódio

Em 100mL de água destilada